

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LETÍCIA CASTELO BRANCO PEROBA DE OLIVEIRA

**PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DA ALGA COMESTÍVEL *Gracilaria birdiae***

**NATAL
2014**

LETÍCIA CASTELO BRANCO PEROBA DE OLIVEIRA

**PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS POLISSACARIDEOS
SULFATADOS DA ALGA COMESTÍVEL *Gracilaria birdiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde
Orientador: Hugo Alexandre de Oliveira
Rocha.

**NATAL
2014**

LETÍCIA CASTELO BRANCO PEROBA DE OLIVEIRA

**PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS POLISSACARIDEOS
SULFATADOS DA ALGA COMESTÍVEL *Gracilaria birdiae***

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha
Departamento de Bioquímica – UFRN
Orientador

Profª Drª Sílvia Regina Batistuzzo de Medeiros
Departamento de Genética- UFRN

Profª Drª Valquíria Pereira de Medeiros
Departamento de Bioquímica- UFJF

DEDICATÓRIA

Dedico:

À Deus. Aos meus filhos tão amados e fundamentais para me impulsionar sempre para que eu avance e seja melhor como pessoa, mãe e profissional, aos meus pais, meu irmão, que sempre me apoiaram e ajudaram em todo o possível e às vezes no que parecia ser impossível.

Especialmente ao meu orientador Hugo por ter sido muito mais que um orientador, mas também um grande amigo que compreendia minhas limitações e me apoiava para superá-las, bem como na paciência com minha ausência durante a gravidez de risco e licença maternidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Aos meus filhos tão amados e fundamentais para me impulsionar sempre para que eu avance e seja melhor como pessoa, mãe e profissional, aos meus pais, meu irmão, e marido que sempre me apoiaram e ajudaram em todo o possível e às vezes no que parecia ser impossível.

Especialmente ao meu orientador Hugo por ter sido muito mais que um orientador, mas também um grande amigo que compreendia minhas limitações e me apoiava para superá-las, bem como na paciência com minha ausência durante a gravidez de risco e licença maternidade.

Aos amigos do BIOPOL, Leandro que foi o primeiro a ter paciência comigo e me ensinar a trabalhar no laboratório com muito bom humor. Gabriel, Arthur e Rony que tanto me auxiliaram em diversos experimentos. Moacir que esteve comigo nos experimentos e especialmente no período de minha gravidez, sempre de bom humor e com boa vontade, sem você eu não teria conseguido Momô!! Karol que foi primordial com as inovações da parte final da minha dissertação! Jailma e Rafael que sempre estavam prontos a ajudar, passando a experiência que tem com delicadeza e carinho! Ivan meu amigo tão divertido, Kaline, minha companheira de risadas, Pablo e Mônica companheiros de UnP, Joana e Danielle, minhas amigas nutris, Popó, Sara, Raniere, Cíntia, Susana, Marília, Almino, Monique, Dayane, Mariana, Ruth, Fernando, Daniel, Max, Vinicius, enfim, todos que ainda que indiretamente, fosse apenas com um bom dia ou um sorriso, foram parte da construção deste trabalho e são biopolescos, amigos que fiz no BIOPOL.

Ao meu orientador Dr. Hugo Alexandre à quem eu tomei a liberdade de chamar de Huguito, que lembrou de mim da época da graduação e aceitou me orientar no Mestrado com toda boa vontade e atenção, à quem eu posso também chamar de amigo, meu muito obrigada por tudo!

“...Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua
direita, mas não chegará a ti...”

Salmos 91:7

RESUMO

As algas marinhas vermelhas do gênero *Gracilaria* sintetizam polissacarídeos sulfatados (PS) bioativos. Porém muitos destes PS ainda não foram devidamente avaliados, como é caso dos PS sintetizados pela alga comestível *Gracilaria birdiae*. Neste trabalho uma galactana (GB) de *G. birdiae* foi obtida e avaliada por diferentes testes. GB apresentou atividade anticoagulante no teste de APTT. Gb não apresentou toxicidade para células normais (3T3), mas inibiu a sobrevivência de células de adenocarcinoma de colo de útero (HeLa) e carcinoma de pâncreas humano (Panc-1) em cerca de 80 % (1.5 mg/mL). GB não foi capaz de sequestrar o radical OH nem o radical superóxido. Contudo, apresentou atividade doadora de elétrons em dois testes diferentes e apresentou atividade quelante de ferro (70% a 1.0 mg/mL) e de cobre (70% a 0.5 mg/mL). A presença de GB promove uma maior formação de cristais de oxalato de cálcio dihidratado de pequeno tamanho, que é a forma menos agressiva, isso porque GB é capaz de interagir com o cristal e estabilizar essa forma. Além disso, GB (2.0 mg/mL) não foi citotóxico para células renais humanas (HEK-293). Os dados obtidos nos levam a propor que GB apresenta um grande potencial para o tratamento de urolitíase.

Palavras-chave: galactana sulfatada; alga vermelha; urolitíase;

ABSTRACT

Red marine algae of the genus *Gracilaria* synthesize sulfated polysaccharides (PS) bioactive. But many of these PS were not properly assessed, as is the case of PS synthesized by edible seaweed *Gracilaria birdiae*. Previous studies showed that sulfated galactans this alga has anti-inflammatory effect. In this work, a galactan (GB) of *G. birdiae* was obtained and evaluated by different tests. GB showed anticoagulant activity in APTT assay. GB showed no toxicity to normal cells (3T3), but inhibited the survival of cells of adenocarcinoma of the cervix (HeLa) and human pancreatic cancer (Panc-1) 80% (1.5 mg / ml). GB was not able to hijack the OH radical or the superoxide radical. However, showed activity electron donor in two different tests and presented iron chelator activity (70% and 1.0 mg / ml) and Copper (70% at 0.5 mg / ml). The presence of a higher GB promotes formation of crystals of calcium oxalate dihydrate small size, which is less aggressive, because GB is able to interact with and stabilize the crystal that form. Furthermore, GB (2.0 mg / mL) was not cytotoxic to human renal cells (HEK-293). The data lead us to propose that GB has a great potential for the treatment of urolithiasis.

Keywords: sulfated galactan; red algae; urolithiasis;

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COD	Oxalato de Cálcio Dihidratado
COM	Oxalato de Cálcio Monohidratado
COT	Oxalato de Cálcio Trihidratado
PS	Polissacarídeos Sulfatados
M	Concentração molar
C	Centrifugado
cm	Centímetros
µg	Microgramas
h	Horas
min	Minutos
GB	Galactana de <i>Gracilaria birdiae</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
mg	Miligramas
APTT	Tempo de tromboplastina parcialmente ativada
PT	Tempo de protrombina
TAC	Capacidade Antioxidante Total
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
mL	Mililitros
TCA	Ácido Tricloroacético
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
NBT	Nitroazul de tetrazólio
Mmol	Milimol
SNA	Declive de Agregação
SNC	Declive de Nucleação
MW	Molecular Weight (Peso molecular)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
PBS	Tampão fosfato-salino (Phosphate Buffered Saline)
EUA	Estados Unidos da América
ζ	Zeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de Cristais de Oxalato de Cálcio. (A) Mono-hidratado; (B) Di-hidratado; (C) Tri-hidratado. Fonte: GRASES et al., 1989

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Algas: considerações gerais.....	12
1.2	Atividade Antioxidante e Anticarcinogênica.....	13
1.3	Urolitíase.....	15
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVOS	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	Purificação de GB.....	20
4.2	Eletroforese em gel de agarose.....	20
4.3	Análise química e composição monossacarídica.....	21
4.4	Atividade Anticoagulante.....	22
4.5	Atividades Antioxidantes in vitro... ..	22
4.5.1	Capacidade Antioxidante Total (TAC)	22
4.5.2	Teste do Poder Redutor.....	22
4.5.3	Ensaio do Sequestro do Radical Hidroxila.....	23
4.5.4	Ensaio de sequestro do radical superóxido.....	23
4.5.5	Quelação férrica.....	23
4.5.6	Quelação cúprica.....	24
4.6.	Ensaio de Cristalização do Oxalato de Cálcio.....	24
4.7	Análise de Imagem de cristal Morfologia.....	25
4.8	Medida de potencial zeta (ζ)	25
4.9	Conjugação de GB com fluoresceína.....	26
4.10	Ensaio de MTT.....	26
4.11	Análise estatística.....	27
5	ARTIGO PRODUZIDO	28
6	COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES	52
7	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas: considerações gerais

As macroalgas marinhas são um grupo de seres vivos aquáticos e autotróficos que apresentam a clorofila a como principal pigmento fotossintético, além da presença de outros pigmentos acessórios, que são características importantes na classificação desses organismos. Elas são divididas em três grupos: Phaeophyceae ou algas marrons, que apresentam o pigmento fucoxantina em sua constituição, que é responsável pela sua coloração característica; Rhodophyceae ou algas vermelhas, que contêm ficoeritrina e Chlorophyceae ou algas verdes que se mostram constituídas principalmente por clorofilas a e b [1].

Os registros mais antigos conhecidos do uso de macroalgas por humanos datam do século 4, no Japão, e do século 6, na China, em ambas situações as algas são citadas como alimento. As algas marinhas apresentam um alto valor nutritivo, possuem carotenóides, proteínas, fibras dietéticas, ácidos graxos essenciais, vitaminas (do complexo B e as vitaminas C, D, E e K) e minerais. Dentre os elementos presentes, há concentrações variadas de cálcio, fósforo, sódio, magnésio, ferro, cobre, manganês, potássio, vanádio, iodo (em quantidades satisfatórias apenas nas algas marrons), num total de aproximadamente 60 (sessenta) elementos diferentes. São utilizadas como fonte de alimentos principalmente nos países asiáticos, chegando a constituir cerca de 25% da dieta humana em países como Japão, China e Coreia do Sul. Vale salientar que regiões das Américas do Sul a do Norte que são habitadas por pessoas de descendência asiática vem apresentando um crescimento contínuo no consumo de algas como alimento [2].

Segundo a Resolução nº 02, de 07/01/2002 [3], a legislação brasileira considera propriedade funcional “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo” e alegação de propriedade de saúde “aquela que sugere, afirma ou implica a existência de relação entre

alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde”. Assim, um alimento funcional apresenta funções nutricionais, metabólicas, terapêuticas e tem uso potencial na prevenção e controle de determinadas doenças e podem ser classificados como: aqueles detentores de propriedades imunológicas e anticarcinogênicas; de prevenção de doenças cardiovasculares, e de propriedade antioxidante [4, 5].

Além do potencial nutritivo das macroalgas, elas também são fontes de diversos compostos bioativos, muitos deles com alto potencial para serem utilizados como fármacos [6, 7, 8]. Dentre estes compostos pode-se destacar os polissacarídeos sulfatados: homo e heterofucanas sulfatadas, galactanas sulfatadas, incluindo carragenanas e agaranas, e muitos heteropolissacarídeos sulfatados. A estes polímeros são atribuídas diversas atividades biológicas como anticoagulante, antioxidante, antiviral, antitumoral, bactericida, imunoestimulante, antiinflamatória, antifúngica, dentre outras [8, 9, 10, 11, 12].

Descreve-se abaixo as atividades atribuídas aos polissacarídeos sulfatados de algas que estão relacionados a esta dissertação.

1.2 Polissacarídeos sulfatados de algas x atividade antioxidante

A ingestão de compostos antioxidantes é utilizada para prevenir o desenvolvimento e a progressão dos danos causados pelo aumento da quantidade de radicais livres. Essa terapia pode ser realizada pela ingestão de antioxidantes e/ou pelo aumento do consumo de alimentos ricos em compostos com esta propriedade [13]. O termo Radical Livre designa átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados [14, 15] conferindo-lhe, dessa forma, alta reatividade. Os radicais podem ter carga positiva, negativa ou neutra. São formados como intermediários necessários em uma variedade de reações bioquímicas normais, mas quando gerados em excesso ou não devidamente controlados podem causar danos em uma ampla gama de macromoléculas [16].

O processo de formação dessas espécies reativas ocorre através de uma reação em cadeia envolvendo três fases (iniciação, propagação e terminação), em

que os antioxidantes podem atuar através de vários mecanismos. Assim, podem-se utilizar vários testes para avaliar a atividade antioxidante de um composto nos diferentes estágios de iniciação (por exemplo: capacidade antioxidante total e poder redutor), de propagação (por exemplo: quelação de cobre e de ferro) e de terminação (por exemplo: sequestro do radical superóxido e de hidroxila) [17].

Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas são compostos com grande potencial para serem usados como compostos antioxidantes na alimentação de humanos, pois podem atuar em cada uma das três fases de formação de radicais livres [18, 19, 20, 21]. Poucos polissacarídeos das algas do gênero *Gracilaria* foram avaliados como antioxidantes. Polissacarídeos da alga *G. caudata* agem tanto na iniciação como também na fase de propagação, porém não possuem capacidade sequestradora de radicais [22]. Com relação aos PS de *G. birdae* foi constatado que esses polímeros inibem a peroxidação lipídica in vivo por sequestrarem radicais hidroxila [23].

1.3 Polissacarídeos sulfatados e carcinogênese

A carcinogênese é um processo altamente complexo do qual participam fatores de risco herdados e fatores de risco ambientais, tais como a alimentação, o hábito de fumar, a ocupação, e a exposição à radiação e a agentes químicos. É um processo com vários passos e vários mecanismos envolvendo eventos genotóxicos (mutações), alteração na expressão de genes a nível transcricional, translacional e pos-translacional (eventos epigenéticos) e alteração da sobrevivência das células (proliferação e apoptose). O câncer já está instalado, evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença [24, 25].

A quimioterapia é uma das formas de tratamento mais comumente utilizada em pacientes com vários tipos de câncer. Entretanto, na maioria dos casos, apenas a quimioterapia não é capaz de produzir resultados terapêuticos satisfatórios na eliminação dos tumores. Além disso, muitos dos fármacos antitumorais empregados possuem consideráveis efeitos colaterais e com baixa viabilidade para o uso clínico [26].

Diante desta situação, em todo o mundo, enormes recursos estão sendo investidos no desenvolvimento de novos compostos que reduzam estes efeitos colaterais durante o tratamento do câncer. E recentes avanços na compreensão destes mecanismos moleculares bem como nas vias específicas tem sido investigados [27]. E dentre esses novos compostos, os polissacarídeos sulfatados de algas estão entre as macromoléculas de origem natural mais estudadas atualmente.

Estudos demonstram que esses polissacarídeos sulfatados possuem atividades antiproliferativa em linhagens celulares tumorais, bem como inibem o crescimento de tumores em murinos [28]

Costa e colaboradores (2010) [22] analisando a atividade antiproliferativa de onze espécies diferentes de algas marinhas (verdes, vermelhas e marrons) em células de câncer cervical (HeLa) observou diferença significativa da atividade antiproliferativa dos polissacarídeos, sendo de maneira dose-dependente.

Noda et al. (1990) [29] pesquisando a atividade antitumoral em 46 algas marinhas, contra carcinoma Ehrlich e Meth-A fibrosarcoma implantados em ratos, através da administração oral de algas em pó, encontrou que as algas *Sargassum ringgoldianum* (Phaeophyta) e *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) foram mais efetivas contra os dois tipos de câncer.

Em estudo *in vivo* κ-carragenanas da alga vermelha *Kappaphycus striatum* modularam o sistema imune de ratos inoculados com S180 e inibiram significativamente o crescimento do tumor transplantado, pela melhora no sistema imune [30]. Outros trabalhos com algas vermelhas revelaram também que as galactanas das algas *Bostrychia montagnei* e *Porphyra columbina* promovem a inibição das células tumorais HeLa na concentração de 0,08 µg/mL, com a presença de células com mitoses e núcleos atípicos [31] .

1.4 Urolitíase

A Urolitíase é uma doença global e multifatorial, caracteriza-se como uma condição fisiopatológica oriunda da formação de cálculos renais, os quais são

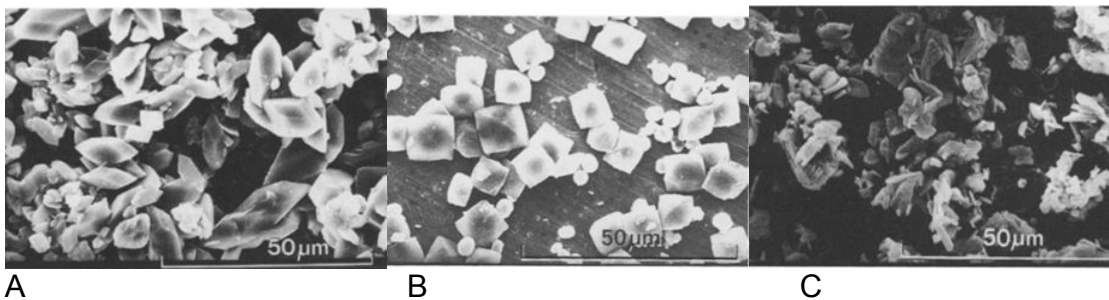
estruturas sólidas, resultantes da aglomeração de cristais, compostos por cristais inorgânicos e orgânicos, e podem estar amalgamados por proteínas. Tais cálculos derivam de uma alteração metabólica crônica do organismo provocando uma excreção aumentada de substâncias pela urina, como cálcio, oxalato, fosfato e/ou diminuição de excreção de substâncias inibidoras da cristalização, como o citrato [32]. Aproximadamente 13% dos homens e 7% das mulheres foram vítimas de cálculos urinários, pelo menos uma vez na vida, e a incidência de litíase urinária continua a aumentar. A formação de cálculos urinários é influenciada pela dieta, fatores ambientais como o sedentarismo, clima e/ou exposição a temperaturas elevadas, hábitos alimentares, entre outros e fatores genéticos [33, 34].

Devido aos estudos dos componentes químicos dos cálculos, foi possível entender o processo de sua formação; trabalhos recentes mostram que cálculos calcários, principalmente formados por oxalato de cálcio, são os mais frequentes na urolitíase, representando mais de 80% dos cálculos encontrados. Aqueles constituídos de ácido úrico representam cerca de 5-10%, seguido pelos constituídos de cistina, estruvita, e cálculos de urato ácido de amônio [32].

O processo de formação do cálculo de oxalato de cálcio é resultado de um processo físico-químico correspondente a três fases: nucleação, crescimento e agregação dos cristais. A primeira condição para a formação de um cristal é a supersaturação urinária, a qual consiste no estado no qual alguns sais se encontram dissolvidos na urina em concentrações muito maiores que as plasmáticas [35]. Os íons, quando em concentrações elevadas em uma solução, tendem a se agrupar, através de suas cargas, formando pequenos cristais. Os cristais, então atraem-se e passam a formar agregados que, progressivamente, crescem até a formação de uma fase sólida [36]. Esse cristal em fase sólida, pode se ligar a proteínas e outras substâncias presentes na urina, originando os cálculos.

Segundo Yu e colaboradores [37], os cristais de oxalato de cálcio desenvolvem-se em três diferentes formas: mono-hidratadas (COM) (Figura 1A), di-hidratadas (COD) (Figura 1B) e tri-hidratadas (COT) (Figura 1C). O COD são

cristais de oxalato de cálcio de geometria piramidal tetragonal que apresentam-se termodinamicamente instáveis. Quando entram em contato com líquido, gradualmente transformam-se em sua forma mais estável, o COM [38,39]. A forma COM é encontrada em grandes quantidades nos cálculos renais, enquanto COD é mais raro. Já o COT possui uma grande instabilidade termodinâmica, sendo raramente encontrado nos cálculos.



A B C
Figura 1: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de Cristais de Oxalato de Cálcio.
(A) Mono-hidratado; (B) Di-hidratado; (C) Tri-hidratado
Fonte: GRASES *et al.*, 1989 [39].

Não existem ainda muitas referências na clínica acerca do tratamento dos cálculos renais por meio de antioxidantes. Contudo, vários antioxidantes específicos são mostrados na literatura impedindo o desenvolvimento do estresse oxidativo induzido por oxalúria [40]. Estudos recentes começaram a testar polissacarídeos sulfatados de algas como antioxidantes protetores das injúrias renais. Estudos *in vitro*, demonstraram que polissacarídeos da *Laminaria Japonica* além de diminuir o tamanho dos cristais COM também estabilizaram o tipo COD, os quais não podem se ligar a membrana [41]. Outro polissacarídeo que mostrou ser eficiente no processo da inibição da cristalização foi da alga marrom *Sargassum Graminifolia* [42].

2. JUSTIFICATIVA

Nos anos 1990 Jaramillo e colaboradores já apontavam o gênero *Gracilaria*, dentre os vários gêneros de algas, como um dos mais promissores devido a sua capacidade de produzir galactanas sulfatadas em grande quantidade [43]. Várias espécies deste gênero são cultivadas como *Gracilaria parvispora* que é a principal espécie cultivada comercialmente no Havaí. No Brasil uma das principais espécies cultivadas é a *Gracilaria birdiae* [44]. Em um estudo prévio as principais características estruturais da galactana sulfatada sintetizada por essa alga foi proposta a partir de dados obtidos após estudos de infravermelho e ressonância magnética nuclear de uma e duas dimensões. Contudo o polissacarídeo obtido por estes autores ainda apresentava-se contaminado por proteínas (6,7%) [45]. Posteriormente, foi demonstrado que este polissacarídeo possui efeito anti-inflamatório *in vivo* [46]. Entretanto, outras atividades da galactana sulfatada de *G. birdiae* ainda não foram avaliadas.

Assim, neste trabalho, utilizando a metodologia de extração proposta por Maciel e colaboradores [45] e adicionando uma proteólise nesta metodologia, com intuito de eliminar a contaminação proteica, obteve-se a galactana sulfatada da alga *G. birdiae* e avaliou-se suas atividades como agente antioxidante, anticoagulante, antiproliferativo e inibidor da formação de cristais de oxalato de cálcio.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antioxidante e o efeito antiproliferativo de extratos aquosos de alga *Gracilaria birdiae*.

3.2 Específicos

- Extrair e quantificar os polifenóis;
- Determinar o percentual de resíduo seco das amostras;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos aquosos através de diferentes sistemas *in vitro* (capacidade antioxidante total, seqüestro do radical hidroxila, seqüestro do radical superóxido, quelação férrica, poder redutor e beta catoreno/ ácido linoléico);
- Avaliar atividade antiproliferativa dos extratos aquosos frente a linhagens de células normais bem como tumorais;
- Apresentar resultados obtidos para comunidade científica na forma de congressos e artigo internacional.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Purificação da galactana de *Gracilaria birdiae* (GalGB)

A alga *Gracilaria birdiae* foi coletada na praia de Rio do Fogo, situado no litoral Nordeste do Rio Grande do Norte, cujas coordenadas geográficas são: latitude 05° 16' 22" Sul e longitude 35° 22' 59" Oeste. A extração de polissacarídeos sulfatados foi adaptada da metodologia descrita por Maciel e colaboradores [45]. A alga após a coleta foi limpa com água corrente e seca em estufa aerada a 45°C por 37 horas. Posteriormente foi triturada e a esse material foi adicionado 2 L de etanol P.A., o material ficou macerando por 12 horas à temperatura ambiente, e foram feitas mais três trocas adicionando-se o mesmo volume de etanol, para se obter a despigmentação e delipidação do material. Após nova secagem sob temperatura ambiente, foram adicionados dois volumes de NaCl 0.25 M ao material resultante, o pH foi ajustado para 8.0 com NaOH e adicionou-se Prozima (protease alcalina), numa proporção de 15 mg de enzima para cada grama de pó, na mistura para digestão proteolítica. Após 18 h de incubação a 60° C, a mistura foi filtrada e centrifugada (10.000 x g, 10 min., 4° C) e o sobrenadante foi precipitado com acréscimo de 2 volumes de metanol. A seguir, o precipitado foi separado da solução por centrifugação (10000 x g, 10 min., 4° C), seco e armazenado. Para as análises posteriores o material foi ressuspenso em água destilada.

4.2 Eletroforese em gel de agarose

Eletroforese em gel de agarose de GalGB foi realizada em 0,6% de gel de agarose (7.5 cm x 10 cm x 0,2 centímetros de espessura) preparado em tampão de acetato de 1,3-diaminopropano 0,05, pH 9,0, como descrito anteriormente [15]. Alíquotas dos polissacarídeos (cerca de 50 µg) foram aplicadas ao gel e sujeito a eletroforese. O gel foi fixado com uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio a 0,1% durante 2 h, secas sob ar quente por 20 min e coradas durante 15 min com 100 mL de 0,1% de azul de toluidina em ácido acético a 1% em etanol a 50% a

temperatura ambiente. A lâmina foi depois descorada utilizando a solução descorante várias vezes até a retirada do excesso de corante.

4.3 Análise química e composição monossacarídica

100 µg de polissacarídeos foram submetidos à hidrólise ácida (4 M de HCl, 100°C, 6 h). O material obtido foi seco sob pressão reduzida na presença de pastilhas de hidróxido de sódio que garantiram uma atmosfera com caráter básico. Posteriormente, o material foi ressuspensionado em água para uma concentração final de 10 µg/µL e este foi utilizada para a determinação do teor de sulfato de acordo com o método de gelatina - bário [47]. Sulfato de sódio foi utilizado como padrão. O teor de proteína foi determinado pelo método de Spector [48]. Para se identificar a melhor condição de hidrólise ácida do polissacarídeo, isto é, em que a degradação do polímero ocorre sem que ocorra a destruição dos monossacarídeos liberados por esta degradação, GalGB foi hidrolisada com HCl 0,5 M, 1 M, 2 M e 4 M, por 30 min, 1, 2 e 4 h, respectivamente. A temperatura de 100° C foi mantida em todas as condições de hidrólise. O material foi depois neutralizado, seco e ressuspensionado em água destilada, e o teor de açúcares redutores, que indica a eficiência da hidrólise, foi determinado como descrito em Câmara e colaboradores [49]. A melhor condição de hidrólise foi de 2 M de HCl durante 2h. Assim, GalGB foi hidrolisado (HCl 2 M, 100° C, 2 h) e a sua composição monossacarídica foi determinada em um sistema LaChrom Elite® HPLC da VWR - Hitachi com um detector de índice de refração (RI detector modelo L -2490), acoplado à uma coluna LiChroCART® 250 (250 mm x 40 mm) empacotada com LiChrospher® 100 NH2 (5 µm). A massa da amostra usada foi de 0,2 mg e o tempo de análise foi de 25 min; como referências, os seguintes açúcares foram usados: arabinose, frutose, fucose, galactose, glicose, glicosamina, ácido glucurônico, manose, ácido manurônico, ramnose e xilose.

4.4 Atividade Anticoagulante

Os Testes APTT e PT foram realizados, tal como descrito em Costa e colaboradores 2013 [50]. Resumidamente, para os dois testes, 10 μ L de uma solução de polissacarídeos em diferentes concentrações são adicionados a 90 μ L de plasma, após 5 min. a 37° C, é adicionado a solução cloreto de cálcio e o reagente conforme descrição do fabricante do kit. A Heparina fracionada (enoxaparina; Sanofi-aventis, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado como padrão.

4.5 Atividades Antioxidantes *in vitro*

4.5.1 Capacidade Antioxidante Total (TAC)

O ensaio está baseado na redução de Mo^{+6} para Mo^{+5} pela amostra e a subsequente formação de um complexo de fosfato de verde / Mo^{+5} numa solução ácida. As amostras foram incubadas a 95° C durante 90 minutos; os tubos continham o GalGB e solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e 4 mM de molibdato de amônio). Após a mistura ter arrefecido até à temperatura ambiente, a absorbância de cada solução foi medida a 695 nm contra um branco num espectrofotômetro marca Hach modelo DR5000. A capacidade antioxidante foi expressa em mg de ácido ascórbico equivalente.

4.5.2 Teste do Poder Redutor

O poder redutor da amostra foi quantificado de acordo com metodologia descrita por Silva e colaboradores [51]. 4 mL das amostras teste em diferentes concentrações (0.10 – 1.00 mg/mL) foram misturadas em tampão fosfato (0.2M, pH 6.6) e ferricianeto de potássio (1%), para incubação por 20 min a 50° C. A reação foi interrompida pela adição de TCA (ácido tricloroacético) a 10%. Posteriormente, foi misturada água destilada e cloreto de ferro (0.1%). As amostras foram lidas a 700 nm num espectrofotômetro marca Hach modelo DR5000.

4.5.3 Ensaio do Sequestro do Radical Hidroxila

O ensaio de sequestro do radical hidroxila foi baseado na reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$) como descrito por Costa et al 2010 [22]. Os radicais hidroxila foram gerados utilizando 3 mL de tampão de fosfato de sódio (150 mM, pH 7.4), que continha 10 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM de EDTA, 2 mM de salicilato de sódio, 30% de H_2O_2 (200 mL) e variando concentrações de GalGB. No controle, tampão fosfato de sódio substituiu o H_2O_2 . As soluções foram incubadas a 37° C durante 1 h, e a presença do radical hidroxila foi detectada através do monitoramento da absorbância a 510 nm. O ácido gálico foi utilizado como controle positivo.

4.5.4 Ensaio de sequestro do radical superóxido

Este ensaio foi baseado na capacidade de polissacarídeos sulfatados de inibir a redução fotoquímica do nitroazul de tetrazólio (NBT), no sistema de riboflavina-luz-NBT. Cada 3 mL de mistura de reação continha tampão de fosfato 50 mM (pH 7.8), 13 mM de metionina, riboflavina 2 mM, EDTA a 100 mM, NBT (75 mM) e 1 mL de solução da amostra. Após a produção de azul de formazan, foi determinado o aumento da absorbância a 560 nm após 10 minutos de iluminação com uma lâmpada fluorescente. A montagem de toda reação foi fechada em uma caixa forrada com papel alumínio. Tubos idênticos à mistura de reação foram mantidos no escuro e serviram como branco da reação. O ácido gálico foi utilizado como controle positivo.

4.5.5 Quelação férrica

A capacidade de quelar ferro de GalGB foi investigada utilizando a seguinte metodologia descrita por Costa e colaboradores, 2010 [22]: GalGB, em diferentes concentrações, foi aplicada a uma mistura de reação que continha FeCl_2 (0.05 mL, 2 mM) e ferrozina (0,2 ml, 5 mM). A mistura foi agitada e incubada durante 10 min à temperatura ambiente e a absorbância da mistura foi medida a 562 nm contra o

branco (cloreto de ferro e ferrozina) em espectrofotômetro (Hach modelo DR5000). O EDTA foi utilizado como controle positivo.

4.5.6 Quelação cúprica

A habilidade de quelar o íon cobre de GalGB foi determinada pelo método descrito em Teodosio Melo e colaboradores [52]. O violeta de pirocatecol, reagente utilizado neste ensaio, tem a capacidade de associar com alguns cátions como alumínio, cobre, bismuto e tório. Na presença de agentes quelantes esta associação não é formada, resultando na diminuição da coloração. Tal diminuição permite, assim, estimar a atividade quelante do íon cobre de GB. O teste é realizado em microplaca de 96 poços que conterá uma mistura de reação contendo diferentes concentrações das amostras (0.1 – 2.0 mg/mL), Violeta de Pirocatecol (4 mM) e Sulfato de Cobre II pentahidratado (50 µg/mL). Todos os poços foram homogeneizados com um auxílio de uma micropipeta e a absorbância da solução foi medida a 632 nm. A habilidade, das amostras, em quelar o íon cobre foi calculada usando a equação abaixo:

$$\frac{\text{Absorbância do branco} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do branco} \times 100}$$

4.6 Ensaio de Cristalização do Oxalato de Cálcio

O efeito de GalGB na cristalização de oxalato de cálcio foi medido espectrofotometricamente durante 30 min a 620 nm, conforme descreve Zhang e colaboradores [53]. Esse ensaio é baseado na quantificação por densidade óptica de soluções metaestáveis de Ca^{2+} e oxalato, utilizando uma solução contendo cloreto de cálcio (8 mmol/L), oxalato de sódio (1 mmol/L), 200 mmol/L de cloreto de sódio e 10 mmol/L de acetato de sódio. As concentrações de compostos presentes nesta mistura são próximas das concentrações fisiológicas urinárias. Essa solução foi agitada e levada ao espectrofotômetro para ser lida a 620 nm, após a obtenção de uma linha de base estável, quando então adicionou-se o polissacarídeo em diferentes concentrações e a cristalização foi induzida pela

adição de solução de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (1 mL). As concentrações finais de cálcio e oxalato foram respectivamente 4 mmol/L e 0,5 mmol/L.

Com os dados obtidos a partir das leituras espectrofotométricas realizadas durante 30 minutos, foi possível construir um gráfico representativo das fases de nucleação (fase ascendente da curva), agregação/precipitação (fase descendente) dos cristais, na presença e na ausência do polissacarídeo. A partir dessa curva foi feita uma análise de regressão linear que permitiu mensurar o percentual de inibição da cristalização. Este percentual foi calculado a partir das taxas de nucleação e de agregação, como se segue: $[1-(\text{SNA}/\text{SNC})] * 100$ para o percentual de nucleação, sendo SNA a inclinação da curva de absorbância da solução de sais na presença das amostras e SNC a inclinação do controle; $[1- (\text{SNA}/\text{SAC})] * 100$ para o percentual de agregação, sendo SNA a inclinação da curva de absorbância da solução de sais na presença das amostras e SAC a inclinação da absorbância do controle.

4.7 Análise de Imagem de Cristal Morfologia

Os cristais foram induzidos a se formarem na presença ou ausência de GalGB como descrito anteriormente. Em seguida, as soluções foram centrifugadas (5000 x g, 4° C, 5 min.) e o sobrenadante foi descartado. Os cristais foram então suspensos em 0,5 mL de água e uma alíquota de 0,1 mL foi posta numa lâmina histológica e levada a um microscópio óptico (NIKON CFI60, Spectrum – Spectrum Bioengenharia médica hospitalar LTDA). A morfologia dos cristais foi analisada em dez campos selecionados aleatoriamente em ampliação de 60 vezes. Foram realizados três experimentos distintos.

4.8 Medida de Potencial Zeta (ζ)

Os cristais foram induzidos a se formarem na presença ou ausência GalGB como descrito anteriormente. Em seguida, as soluções foram centrifugadas (5000 x g, 4° C, 5 min). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi então

suspendido com 1,5 mL de água e o potencial zeta das amostras (ζ) foi obtido com o uso do analisador Zeta Plus (Zeta Plus® Brookhaven instruments).

4.9 Conjugação de GalGB com fluoresceína

A conjugação de GalGB com fluoresceína foi realizada por ligação covalente do sal de sódio de fluoresceína (Sigma) com o polissacarídeo. Resumidamente, 5 mg de GalGB reagiram com 1 mg de fluoresceína na solução 0,1 M de PBS (pH 7,0) sob agitação durante 1 hora, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. A solução foi dialisada contra água destilada por 48 horas (Mw de 12 kDa), e durante esse período foram realizadas 6 trocas da água, sendo em seguida, liofilizado.

4.10 Ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol- 2 - il) -2,5-difeniltetrazólio]

As células HeLa (adenocarcinoma cervical humano), 3T3 (fibroblasto murínico), HEK-293 (célula epitelial renal humana) e PANC (adenocarcinoma pancreático) foram cultivadas em frascos de cultura (TPP) contendo meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% soro fetal bovino (Cutilab) e com 100 μ g/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina (Sigma). Para a realização do experimento as células foram removidas com uma solução de tripsina/EDTA (Cutilab), centrifugadas e lavadas com meio sem soro para a retirada da tripsina, posteriormente foram ressuspensas em meio com soro, contadas e colocadas em placas de 96 poços (TPP) a uma densidade de 5×10^3 células/poço e deixadas a aderir durante a noite, a 37° C e 5% de CO₂. Após esse período, o meio foi retirado, as placas foram lavadas duas vezes com meio sem soro, e adicionou-se 200 μ L de meio sem soro para carenciamento das células. 24 horas após o meio foi aspirado e as células foram induzidas a divisão celular na presença de meio com soro na ausência ou presença de diferentes concentrações de GalGB (125, 250, 500, 1000, 1500 ou 2000 mg/mL). Após o tempo determinado (24, 48 ou 72 h) de incubação, os vestígios de GalGB foram removidos por lavagem das células com PBS e foi adicionado meio fresco contendo 12 mM de

MTT (Sigma). As células foram então incubadas durante 4h a 37° C e 5% de CO₂. Após esse período, o MTT reduzido pelas células foi solubilizado com 100 µL de isopropanol contendo 0,04 N de HCl e agitados por 5min. Num agitador de bancadas na velocidade de 40 rpm., em seguida, as placas contendo o MTT solubilizado foram submetidas a leitura num comprimento de 570nm utilizando um leitor de microplacas Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Franklin, MA, EUA). O controle positivo foram as células incubadas na ausência dos polissacarídeos. A porcentagem de proliferação celular foi calculada como se segue:

$$\text{Proliferação celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 100}{\text{absorbância do controle}}$$

4.11 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como a média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way. Student-Newman-Keuls post-testes foram realizados por comparação múltipla grupo. Em todos os casos, a significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

5. ARTIGO PRODUZIDO

O artigo abaixo está nos moldes exigidos pelo setor editorial da revista Marine Drugs e será submetido à esta para apreciação e possível publicação.

marine drugs

ISSN 1660-3397

www.mdpi.com/journal/marinedrugs

Article

Propriedades bioativas do polissacarídeo sulfatado da alga comestível *Gracilaria birdiae*

Leticia Castelo Branco Peroba Oliveira^{1,2,†}, Moacir Fernandes Queiroz^{1,†}, Gabriel Pereira Fidelis¹, Arthur Anthunes Jacome Vidal¹, Karoline Rachel Teodosio Melo¹, Rafael Barros Gomes Camara¹, Leandro Silva Costa³ and Hugo Alexandre Oliveira Rocha^{1,2,*}

¹ Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL), Departamento de Bioquímica,

Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte, 59078-970, Brazil; e-mails: melo.krt@gmail.com, (K.R.T.M.); rafael_bgc@yahoo.com.br (R.B.G.C); arthur_bio@hotmail.com (A.A.J.V.); moacirfq@gmail.com (M.F.Q.); hugo@cb.ufrn.br (H.A.O.R.)

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte, 59078-970, Brazil. E-mail: lecastelo@hotmail.com (L.C.B.P.O);

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFRN), Santa Cruz, Rio Grande do Norte, 59200000, Brazil; E-Mail: leandro-silva-costa@hotmail.com.

† Esses autores contribuíram igualmente para o trabalho

* Autor a quem correspondência deve ser endereçada; E-Mail: hugo@cb.ufrn.br; Tel.: +55-84-32153416 (ext. 207); Fax: +55-84-32119208.

Resumo: As algas marinhas vermelhas do gênero *Gracilaria* sintetizam polissacarídeos sulfatados (PS) bioativos. Porém muitos destes PS ainda não foram devidamente avaliados, como é caso dos PS sintetizados pela alga comestível *Gracilaria birdiae*. Estudos anteriores mostraram que galactanas sulfatadas dessa alga tem efeito antiinflamatório. Neste trabalho uma galactana (GalGB) de *G. birdiae* foi obtida e avaliada por diferentes testes. GB apresentou atividade anticoagulante no teste de aPTT. GalGB não apresentou toxicidade para células normais (3T3), mas inibiu a sobrevivência de células de adenocarcinoma de colo de útero (HeLa) e human pancreatic carcinoma (PANC-1) em cerca de 80 % (1.5 mg/mL). GalGB não foi capaz de sequestrar o radical (OH[•]) nem o radical superóxido (O₂⁻). Contudo, apresentou atividade doadora de elétrons em dois testes diferentes e apresentou atividade quelante de ferro (70% a 1.0 mg/mL) e de cobre (70% a 0.5 mg/mL). A presença de GalGB promove uma maior formação de cristais de oxalato de cálcio dihidratado de pequeno tamanho, que é a forma menos agressiva, isso porque GalGB é capaz de interagir com o cristal e estabilizar essa forma. Além disso, GalGB (2.0 mg/mL) não foi citotóxico para células renais humanas (HEK-293). Os dados obtidos nos levam a propor que GalGB apresenta um grande potencial para o tratamento de urolitíase.

Keywords: galactana sulfatada; alga vermelha; urolitíase;

1. Introdução

As macroalgas marinhas são um grupo de seres vivos aquáticos e autotróficos que apresentam a clorofila "a" como principal pigmento fotossintético, além da presença de outros pigmentos acessórios, que são características importantes na classificação desses organismos. Elas são divididas em três grupos: Phaeophyceae ou algas marrons, que apresentam o pigmento fucoxantina em sua constituição, que é responsável pela sua coloração característica; Rhodophyceae ou algas vermelhas, que contêm ficoeritrina e Chlorophyceae ou algas verdes que se mostram constituídas principalmente por clorofilas "a" e "b" [1].

Os registros mais antigos conhecidos do uso de macroalgas por humanos datam do século IV, no Japão, e do século VI, na China, em ambas situações as algas são citadas como fonte de alimento. As algas marinhas apresentam um alto valor nutritivo, são ricas em carotenóides, proteínas, fibras dietéticas, ácidos graxos essenciais, vitaminas (do complexo B e as vitaminas C, D, E e K) e minerais. Dentre os elementos presentes, há concentrações variadas de cálcio, fósforo, sódio, magnésio, ferro, cobre, manganês, potássio, vanádio e iodo (em quantidades satisfatórias apenas nas algas marrons), num total de aproximadamente 60 elementos diferentes. São utilizadas como fonte de alimentos

principalmente nos países asiáticos, chegando a constituir cerca de 25% da dieta humana em países como Japão, China e Coreia do Sul. Contudo, regiões das Américas do Sul e do Norte, que são habitadas por pessoas de descendência asiática, vêm apresentando um crescimento contínuo no consumo de algas como alimento. Na Europa, principalmente na França, Itália, Grécia e Irlanda, esforços vêm sendo realizados para que ela se torne um alimento mais popular [2].

Além do potencial alimentar das macroalgas, elas também são fontes de diversos compostos bioativos, muitos deles com alto potencial para serem utilizados como fármacos [3, 4, 5]. Dentre estes compostos nós podemos destacar os polissacarídeos sulfatados: sulfated homo and heterofucans, sulfated galactans, including carragenans and agarans, and several sulfated heteropolysaccharides. A estes polímeros são atribuídas diversas atividades como anticoagulante, antioxidante, antiviral, antitumoral, bactericida, imunoestimulante, antiinflamatória, antifúngica, dentre outras. Há vários artigos recentes que revisam muito bem estas atividades [5, 6, 7, 8, 9].

Nos anos 1990 Jaramillo e colaboradores já apontavam o gênero *Gracilaria*, dentre os vários gêneros de algas, como um dos mais promissores devido a sua capacidade de produzir galactanas sulfatadas em grande quantidade [10]. Várias espécies deste gênero são cultivadas como a *Gracilaria parvispora* que é a principal espécie cultivada comercialmente no Havaí. No Brasil uma das principais espécies cultivadas é a *Gracilaria birdiae* [11]. Em um estudo prévio as principais características estruturais da galactana sulfatada sintetizada por essa alga foi proposta a partir de dados obtidos após estudos de infravermelho e ressonância magnética nuclear de uma e duas dimensões. Contudo o polissacarídeo obtido por estes autores ainda apresentava-se contaminado por proteínas (6,7%) [12]. Posteriormente, foi demonstrado que este polissacarídeo possui efeito antiinflamatório *in vivo* [13]. Contudo, outras atividades da galactana sulfatada de *G. birdiae* ainda não foram avaliadas.

Assim, neste trabalho, utilizando a metodologia de extração proposta por Maciel e colaboradores [12] e adicionando uma proteólise nesta metodologia, com intuito de eliminar a contaminação proteica, obteve-se a galactana sulfatada da alga *G. birdiae* e avaliaram-se as suas atividades como agente antioxidante, anticoagulante, antiproliferativo e inibidor da formação de cristais de oxalato de cálcio.

2. Resultados e Discussão

2.1. Obtenção e caracterização de GalGB

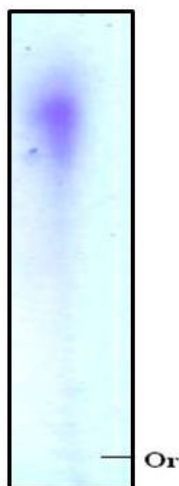
Para a obtenção do polissacarídeo sulfato de *G. birdiae*, a alga foi misturada em água, o pH da suspensão foi ajustado para 8 e foi adicionado uma mistura de enzimas proteolíticas. Durante este processo, ocorre a degradação das proteínas que estão ligadas aos polissacarídeos, o que permite a solubilização de um maior número de moléculas de polissacarídeos [14]. Assim, obteve-se 720 mg de polissacarídeos sulfatados a partir de 5 g de alga, o que corresponde a 14.4%. Este rendimento foi 2,5 vezes maior do que aquele obtida por Maciel e colaboradores [12], apesar de terem utilizado uma metodologia de extração semelhante a aquela descrita aqui. Um possível explicação para este maior

rendimento é o fato de termos utilizado a proteólise como passo adicional, e Maciel e colaboradores [12] não. Os polissacarídeos nas algas estão presos de forma covalente ou não as proteínas da parede celular, ao se fazer a proteólise, estas proteínas são degradadas e os polissacarídeos que estavam presas a elas se solubilizam mais facilmente.

A fim de se verificar a homogeneidade de GalGB, ele foi submetido a um sistema de eletroforese em gel agarose em tampão PDA (Figura 1). Nessa figura observa-se apenas uma banda corada com azul de toluidina, o que indica a presença de apenas um tipo de polissacarídeo sulfatado.

Neste sistema é possível afirmar isso devido a propriedade de 1,3-diaminopropano/tampão acetato. A diamina é capaz de se complexar com GalGB através dos seus grupos sulfatos tal como foi anteriormente observado para os glicosaminoglicanos sulfatados [15]. Esta complexação é mais dependente do espaçamento das cargas vicinais do que da carga negativa total dos compostos [15].

Figura 1. Electroforese em gel de agarose de GalGB. Cerca de 5 mL alíquotas (50 ug) do GB foi aplicado no gel de agarose (107,5 centímetros, 0,2 cm de espessura) preparada em 0,05 M tampão de 1,3-diaminopropano-acetato, pH 9,0 e submetidas a eletroforese a 110 V / cm durante 60 min. O gel foi, em seguida, mantido em 0,1% de brometo de cetiltrimetilamônio, durante 2 horas e seco, e o polissacárido foi corado com azul de toluidina a 0,1% em uma solução contendo 50% de etanol e 1% de ácido acético em água durante 15 min. Os géis foram então descoradas com a mesma solução sem azul de toluidina. (Or - origem).



Com relação à caracterização química de GalGB, na Tabela 1 têm-se o resumo dos dados obtidos por meio das análises químicas realizadas. Pode-se observar que o percentual de sulfato correspondeu a 10,7%, o que foi superior a aquela encontrada por Maciel e colaboradores (~ 6,4%) [12]. Já com relação a contaminação por proteínas e compostos fenólicos pode-se afirmar que GalGB apresentou valores baixos destes contaminantes, em

torno de 0.5 e 0.1 % respectivamente. O valor de contaminação proteica encontrada por Maciel e colaboradores foi de 7,6%, que foi muito superior ao descrito aqui neste trabalho, o que mostra que o uso de proteases é muito importante para promover a retirada das proteínas contaminantes. Maciel e colaboradores não determinaram o grau de contaminação da amostra deles por compostos fenólicos, por esse motivo não foi possível fazer uma comparação entre os resultados aqui apresentados e os desses autores.

Tabela 1. Teor de sulfato, proteína e compostos fenólicos e relação molar dos monossacarídeos constituintes de GalGB

Polissacarídeo Sulfatado	Sulfato (%)	Proteínas (%)	Comp. Fenólicos (%)	Razão Molar ¹			
				Gal ¹	Glu ¹	Ara ¹	Xil ¹
GalGB	10,7± 0,6	0,5 ± 0,05	0,1 ± 0,02	1,0	0,3	0,5	1,9

¹ Razão Molar utilizando a glicose como parâmetro. **Gal** - Galactose, **Glu** - Glucose, **Xil** - Xilose, **Ara**-Arabinose

Com relação à composição monossacarídica, foram encontradas galactose, glicose, arabinose e xilose (Tabela 1). Esta composição é bastante diferente da descrita por Maciel e colaboradores, esses autores afirmam que o polissacarídeo sulfatado obtido por eles era constituído apenas por galactose. Não foram identificados trabalhos que avaliassem alteração da composição monossacarídica de polissacarídeos sulfatados obtidos da mesma espécie de alga vermelha coletada em lugares e/ou períodos diferentes, mas trabalhos mostram que galactofucanas sulfatadas quando extraídas da alga marrom *Saccharina longicuris* em quatro períodos (maio, agosto e novembro de 2005 e junho de 2006) apresentam composição monossacarídica diferente [16]. As algas utilizadas aqui neste trabalho foram coletadas num ano diferente e em um local diferente que aquelas coletadas por Maciel e colaboradores [12], o que fez com as algas estivessem expostas a fatores biótico e abióticos diferentes, o que pode justificar a diferença na composição dos monossacarídeos apresentados nesses dois trabalhos.

2.2. Avaliação da atividade anticoagulante de GalGB

A atividade anticoagulante in vitro de GalGB foi avaliada pelos ensaios de PT e aPTT. No teste de PT, o qual avalia a via extrínseca da cascata de coagulação, a amostra não foi capaz de dobrar o tempo de coagulação até uma massa de 100 µg, indicando a ausência de atividade para esse teste. Por outro lado, no teste de aPTT, cujo princípio é avaliar a via intrínseca e/ou comum da coagulação, GalGB foi capaz de dobrar o tempo de coagulação com uma massa 100 µg (tabela 2).

Tabela 2. Atividade Anticoagulante de GalGB

Polissacarídeo Sulfatado	aPTT (μg)	PT ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)
GalGB	100	^a
Clexane [®] (0.1mg/mL)	10	^b

Os resultados são expressos como a massa mínima necessária para dobra o tempo de coagulação em comparação ao controle. n= 3. ^a não detectado. ^b não determinado. Clexane (enoxheparina) controle positivo.

O efeito anticoagulante da GalGB não foi tão pronunciado quando comparado com outros polissacarídeos sulfatados, por exemplo, galactanas sulfatadas da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* apresentam um efeito anticoagulante com massas bem menores do que a encontrada com GalGB [17]. Vale salientar, que galactanas sulfatadas de outra *Gracilaria* (*G. caudata*) não apresentaram efeito coagulante [14] quando testadas com massas semelhantes às utilizadas com GalGB aqui neste artigo, o que parece indicar que polissacarídeos sulfatados sintetizados por algas do gênero *Gracilaria* não apresentam forte efeito anticoagulante. Porém, dados com polissacarídeos de outras espécies do gênero *Gracilaria* precisam ser obtidos para se confirmar esta hipótese.

2.3. Avaliação do efeito antioxidante de GalGB

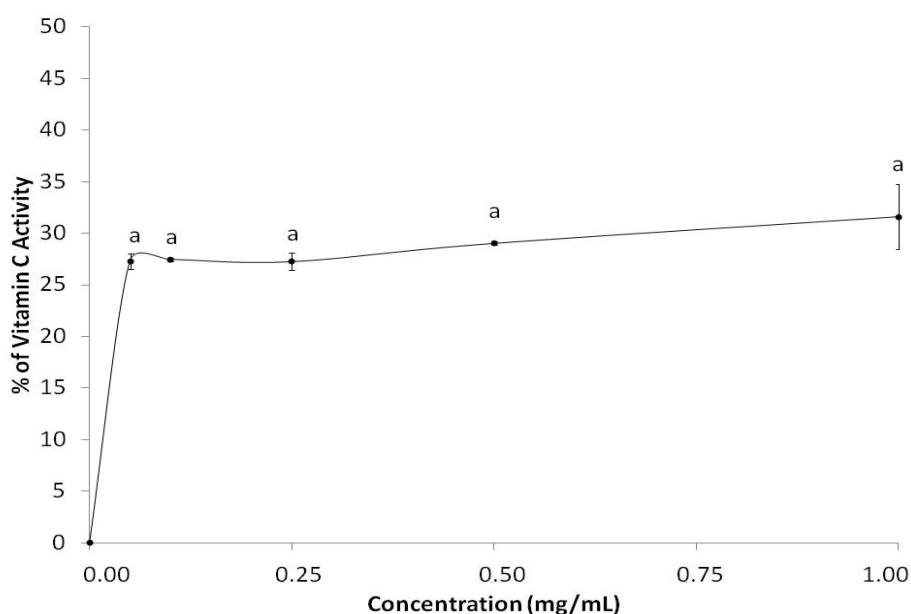
A oxidação de substratos ocorre através de uma cadeia de eventos que envolvem três estágios (iniciação, propagação e terminação). Para que um composto aja como antioxidante, ele deve agir em alguma dessas etapas. Porém, em quanto mais etapas ele agir, melhor composto antioxidante ele será. Polissacarídeos sulfatados extraídos de algas são apontados como compostos antioxidantes por vários autores [18], pois são capazes de agir por vários mecanismos. Em um trabalho anterior, foi demonstrado que polissacarídeos da alga *Gracilaria birdiae* possui efeito antioxidante, porém esta atividade só foi avaliada pelo método de sequestro de DPPH [19]. No entanto, vários trabalhos demonstraram que diferentes métodos e ensaios antioxidante *in vitro* estão sendo utilizados para avaliar a atividade das biomoléculas [20]. Assim, utilizou-se seis métodos para avaliar o efeito do GalGB em iniciação (capacidade total antioxidante e poder redutor), propagação (quelante de ferro) e terminação (superóxido e atividades de eliminação de radicais hidroxila) etapas.

Inicialmente GalGB foi analisado pelo ensaio de Capacidade Antioxidante Total (CAT). Neste teste GalGB apresentou uma atividade correspondente a $86,6 \pm 10,8$ mg de equivalente de ácido ascórbico. Esta atividade foi superior a aquela descrita para polissacarídeos sulfatados de outras algas como *Sargassum filipendula* [21], *Dictyopteris justii* [22], como também foi superior a aquela descrita para polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria caudata*, que apresentou aproximadamente 56,5 mg de equivalente de ácido ascórbico [14]. O que mostra que GalGB é um polissacarídeo sulfatado bom doador de elétrons.

O teste do Poder Redutor é expresso como atividade redutora equivalente, calculado a partir da razão da atividade redutora encontrada para os compostos e aquela encontrada para a vitamina C na concentração de 0,2 mg/mL. Os dados obtidos com GalGB são

mostrados na figura 2. Como pode ser observado, GalGB apresentou efeito redutor. Contudo, este efeito não foi dose dependente.

Figura 2. Poder redutor do extrato bruto de Polissacarídeos Sulfatados da *Gracilaria birdiae*. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. O poder redutor é expresso como uma porcentagem da atividade apresentada por 0,2 mg / mL de ácido ascórbico. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de algas sulfatada por one-way Anova seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). * ^a não apresentou diferenças significativas.



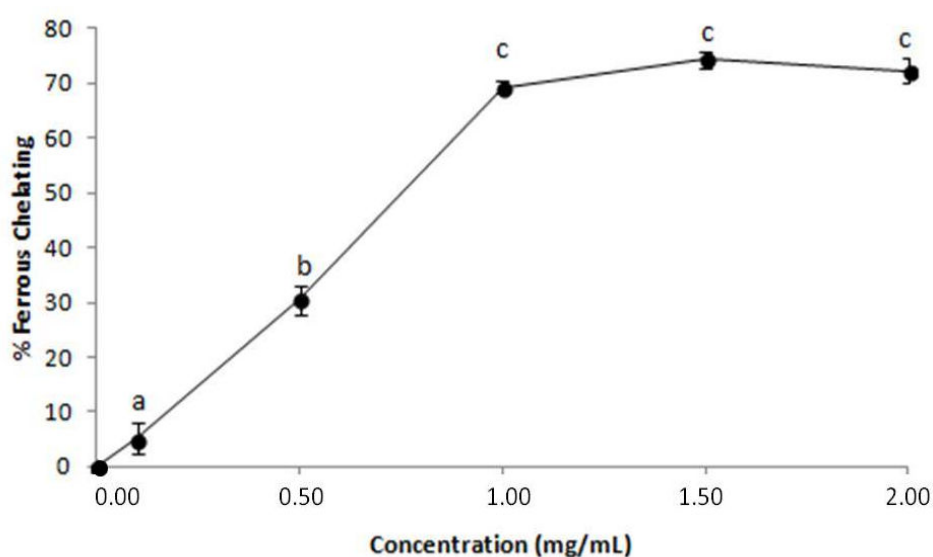
Tanto CAT como o teste do poder redutor avaliam a capacidade de uma amostra em doar elétrons. Contudo, cada um desses testes é feito em ambiente químico diferente, o que mostra que GalGB é um bom doador de elétrons em diferentes ambientes. Esta característica é muito interessante, pois GalGB poderá apresentar atividade doadora de elétrons em ambientes celulares distintos, como mitocôndrias, citoplasma e núcleo, a assim agir como antioxidante em diversos locais das células.

GalGB não apresentou efeito sequestrador de radicais hidroxila e superóxido. Polissacarídeos de várias algas também não possuem esta atividade ou são pouco potentes como sequestradores desses radicais [14,24], o que mostra que este não é o principal mecanismo antioxidante dos polissacarídeos sulfatados de algas.

Na figura 3 é mostrado a atividade de quelação férrica de GalGB. Com base na figura, é possível observar que GalGB possui um efeito dose-dependente que se estabiliza em torno de 1 mg/mL, concentração em que o percentual de quelação está em torno de $69,3\% \pm 1,1$. Esta atividade foi superior a aquela observada com outro polissacarídeos sulfatados de algas marinhas [25, 26] e foi similar a aquela encontrada com o

polissacarídeo sulfatado das algas *G. caudata* [14] e *Caulerpa cupressoides* [23]. Esses resultados mostram que GalGB é um bom quelante de ferro, e como tal age como antioxidante porque é capaz de inibir a reação de Fenton. Nesta reação o ferro reage com peróxido de hidrogênio o que leva a produção do radical hidroxila, que é um dos radicais mais danosos que se conhece [25].

Figura 3. Efeito quelante de GalGB em íons de ferro. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de GalGB por one-way Anova seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0.05$). * a, b, c letras diferentes denotam diferenças significativas entre cada concentração.

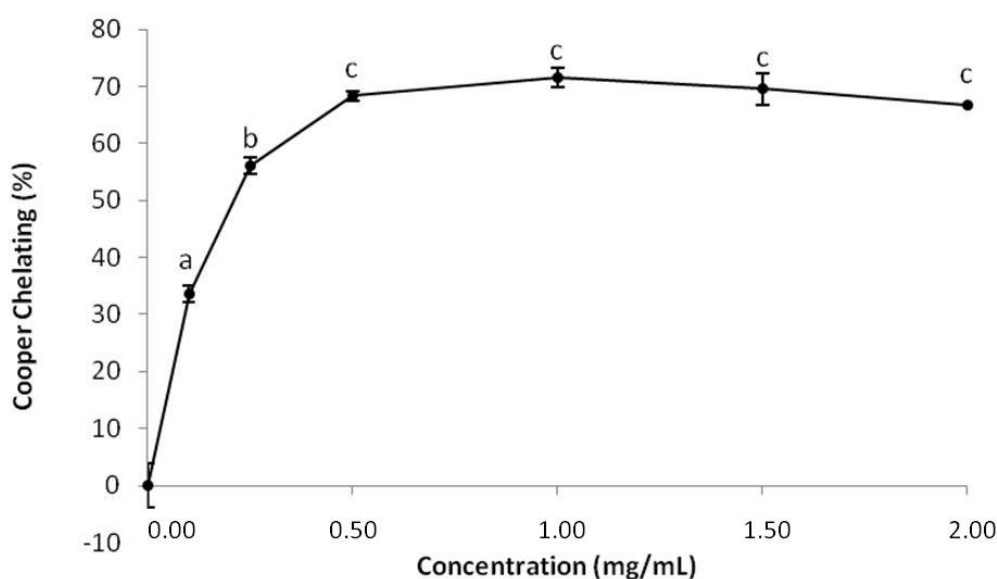


Observa-se, com base nos dados apresentados na figura 4 que GalGB apresentou atividade quelante cúprica de forma dose dependente até a concentração máxima de 1 mg/mL, quando o índice de quelação aproximou-se de 71%. Foi identificado apenas outro trabalho que avaliou a capacidade quelante de cobre de polissacarídeos sulfatados, nesse os autores mostram que fucanas sulfatadas da alga *Dictyopteris justii* apresentam atividade quelante de cobre de 65% (2 mg/mL), já glucanas sulfatadas (2 mg/mL) desta mesma alga apresentam atividade em torno de 80% [22], o que é superior a aquela encontra para GalGB.

Com o aumento da concentração de cobre tem-se um aumento na produção de espécies reativas do oxigênio devido em grande parte a reações de Fenton [27] e de Haber-Weiss [28]. Além disso, através da reação de Fenton, os hidroperóxidos de lípidos pré-formados (LOOH) são decompostos para formar os radicais alcóxil (LO·), oxidantes fortes, que podem propagar a reação em cadeia da peroxidação lipídica [29] ou reagir com outros constituintes celulares. Por consequência, a quelação de íons Cu^{2+} pode ser crucial para a prevenção da produção de espécies reativas que danificam as biomoléculas-alvo. Portanto,

essa propriedade quelante de cobre de GalGB é uma característica interessante para indicá-lo como um composto para ser utilizado como antioxidante (figura 4).

Figure 4. Atividade quelante de Cobre por GalGB. Cada valor é a média \pm desvio padrão de três determinações: Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre cada concentração. * a, b, c letras diferentes denotam diferenças significativas entre cada concentração.



Alguns autores correlacionam o efeito quelante de metais dos polissacarídeos sulfatados justamente a presença dos grupos sulfato em suas estruturas. Contudo, polissacarídeos que não são sulfatados, como xilana de sabugo milho [29], apresentam alta atividade quelante de metal. Estudos posteriores, inclusive com derivados dessulfatados de GalGB, mostrarão a importância ou não dos grupamentos sulfato para que GalGB apresente efeito quelante de metal. Vale salientar, que o efeito quelante também é importante para indicar o uso deste polissacarídeo como composto que possa ser utilizado como componente de filtros de purificação de água e outros líquidos contaminados por cobre e/ou ferro.

2.4. Ensaio *In Vitro* da inibição da cristalização de sais de oxalato de cálcio

As propriedades antioxidantes observadas para GalGB também podem ser importantes no tratamento de diversas doenças, como câncer, aterosclerose, bem como na proteção de tecidos contra os danos causados por agentes oxidantes. Por exemplo, foi demonstrado que antioxidantes como vitamina E e ácido ascórbico protegem o tecido renal

de danos provocados por espécies reativas de oxigênio (ROS) sintetizadas devido ao aumento da concentração de oxalato de cálcio extra e intracelular [30] ROS são apontadas por modularem positivamente as fases de formação dos cristais [31]. Para que estes cristais se formem é necessário que a urina esteja super saturada em oxalato de cálcio. Quando esta supersaturação urinária excede o limite de metaestabilidade, os íons de oxalato de cálcio começam a formar o núcleo do cristal (nucleação), que com deposição de novos íons, o núcleo passa a crescer (crescimento) de forma ordenada gerando o nanocristal. Por conseguinte, os nanocristais crescentes agregam-se uns aos outros formando aglomerados (agregação) que se precipitam [32].

Cristais de oxalato de cálcio são a principal causa de urolitíase, uma doença que acomete cerca de 10% da população mundial, e não há ainda um composto efetivo que possa ser utilizado no tratamento dessa doença [33]. Zhang e colaboradores [34] mostraram que polissacarídeos sulfatados da alga marrom *Sargassum graminifolium* tem capacidade de inibir tanto a nucleação como a agregação de cristais de oxalato de cálcio *in vitro*. Como não se identificou trabalhos que avaliaram o efeito de polissacarídeos de algas vermelhas como inibidores de formação de cristais de oxalato, e como GalGB apresentou atividade antioxidante, avaliou-se se GalGB era capaz de inibir formação de cristais de oxalato *in vitro*.

Os resultados mostraram que GalGB (125 mg) estimula a nucleação em 6.2% em comparação ao controle, este valor sobe para 67.2% quando se usou 250 mg de GalGB. Este foi um resultado surpreendente, pois muitos relatos evidenciam o fato de que a nucleação dos cristais de oxalato pode ser inibida pela presença de poliânions como proteínas e polissacarídeos [35]. Contudo, Teodosio Melo e colaboradores [22] mostraram que uma glucana sulfatada extraída da alga *D. justii* não foi capaz de inibir a nucleação dos cristais, o que indica que a inibição da nucleação não é meramente dependente da presença de cargas negativas na estrutura do polissacarídeo, mas que provavelmente a disposição destas cargas e a conformação que o polímero assume em solução são mais importantes para que um polissacarídeo iniba ou estimule a nucleação dos cristais. Já com relação à agregação GalGB inibiu esta etapa em 15.2% (125 mg) e 28.2% (250 mg) respectivamente. Este valor foi menor do que aquele obtido com polissacarídeos sulfatados de *S. graminifolium*, que apresentaram valor de inibição de nucleação de 76% [35].

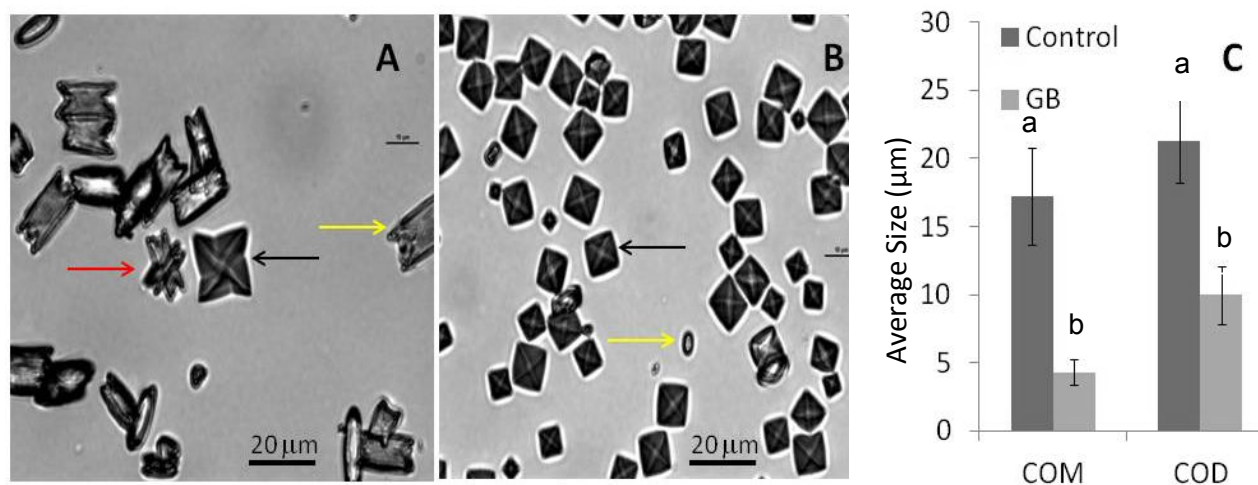
Em suma os dados mostram que GalGB estimula a formação de cristais, porém inibe a agregação, provavelmente por impedir que se formem cristais grandes. Para confirmar esta hipótese, nós verificamos o tamanho e a morfologia dos cristais de oxalato de cálcio formados na presença de GalGB.

Os cristais de CaOx desenvolvem-se em três diferentes formas: monohidratada (COM), desidratada (COD) e tri-hidratada (COT). Os cristais de COM apresentam uma geometria de prisma tetragonal alongada, com superfície externa irregular, uma estrutura densa e elevada dureza. Os cálculos de COM consistem basicamente de um núcleo onde os cristais se depositam de modo concêntrico, e uma camada intermediária estriada radialmente. Os COD são cristais de oxalato de cálcio de geometria “tetragonal bipyramids” que se apresentam termodinamicamente instáveis. Em contato com líquido gradualmente eles se transformam na forma mais estável, o COM. A forma COM é encontrada em grandes quantidades nos cálculos renais, enquanto COD é mais raro. Já o

COT possui uma grande instabilidade termodinâmica, sendo raramente encontrado nos cálculos. [36]

Na figura 05 pode-se observar os cristais formados nas condições controle. Nessas condições são formados os três tipos de cristais de CaOx como indicado na legenda da figura 5. Ao se comparar as duas figuras se observa claramente que há um maior número de cristais na figura 5B, na verdade, sem a presença de GalGB observa-se em média 14 ± 0.7 cristais por campo enquanto que na presença do polissacarídeo o número de cristais aumenta para cerca de 47 ± 6 por campo. Estes dados comprovam o que tinha sido observado no ensaio anterior, e indicam que GalGB estimula uma formação de mais cristais de oxalato em comparação ao controle. Outro fator importante que pode ser destacado é que quando esses cristais foram contados se verificou que nas condições controle havia em média uma proporção COD:COM de 1:6 por campo. A presença de GalGB modificou a proporção COD:COM para 3:1 por campo.

Figure 5. Cristais de CaOx observados sob microscopia invertida. Eles são formados em soluções metaestáveis de caOx na ausência (A) e presença (B) de GalGB (0,1 mg/mL). Flechas amarelas indicam forma COM; flechas pretas indicam forma COD e flechas vermelhas mostram COT form; (C) Tamanho (um) dos cristais formados. Escala de barras = 20 μ m. Diferentes letras indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre cada concentração.



Não só o número de cristais COM e COD foram alterados pela presença de GalGB, o tamanho e a morfologia desses cristais também foram alterados. Os cristais COM no grupo controle apresentam uma morfologia retangular (Fig. 5a) e um tamanho médio de $17.2 \pm 3.5 \mu$ m (Fig. 5c), com a presença de GalGB o tamanho médio dos cristais COM foi de $4.3 \pm 0.9 \mu$ m (Fig. 5c). GalGB também teve efeito sobre o tamanho dos cristais COD, neste caso o tamanho dos cristais caiu de $21.3 \pm 3.0 \mu$ m para $9.98 \pm 2.1 \mu$ m devido à presença de GalGB. A constatação da diminuição do tamanho dos cristais devido a presença de GalGB comprova os dados de inibição da agregação vistos no ensaio anterior,

GalGB inibe agregação, por isso os cristais são menores.

Com relação à morfologia dos cristais, a presença de GalGB fez com que os cristais (COM e COD) formados apresentassem um formato mais esferoidal (Fig 5b), o que indica que GalGB interfere na rede cristalina a ponto de impedir que se formem cristais de CaOx perfeitos.

A presença de GalGB estimula nucleação, por isso se observou um aumento no número de cristais formados, por outro lado, a presença de GalGB diminui a agregação pois diminui o tamanho dos cristais. A nossa hipótese é que as moléculas de GalGB, ao interagirem com a oxalato de cálcio, funcionariam como núcleos de formação de cristais, quanto mais moléculas de GalGB mais cristais são formados. Com a presença de tantos núcleos crescendo ao mesmo tempo para formarem cristais, o oxalato de cálcio é consumido, a sua concentração cai abaixo do nível de saturação e os cristais param de crescer, o que justificaria o menor tamanho dos cristais e o efeito inibitório de GalGB na fase de agregação.

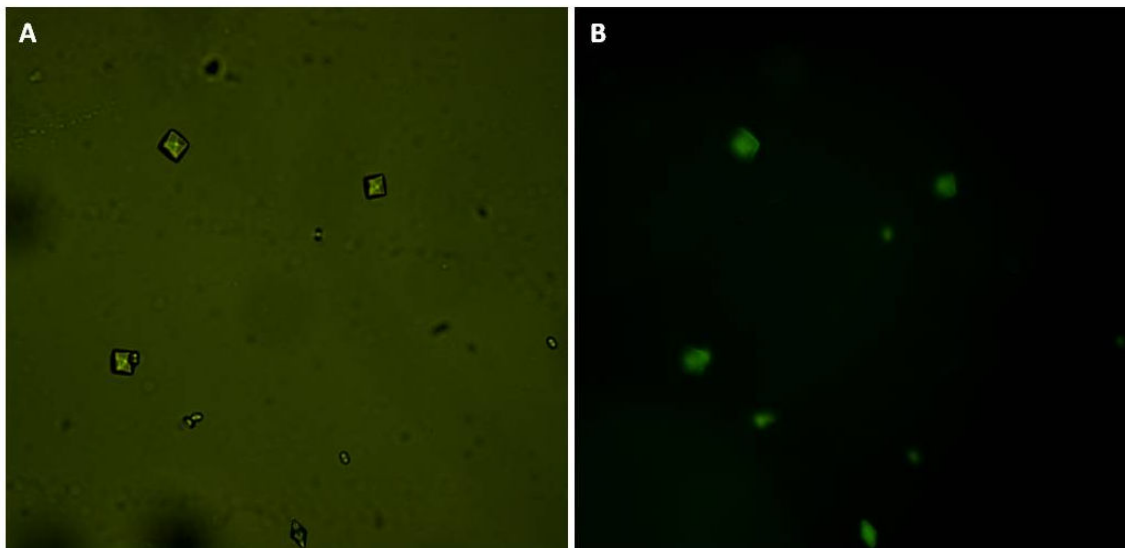
Outro fator relevante é morfologia dos cristais. A geometria mais arredondada dos cristais COM e COD indica que eles estão mais amorfos, o que é provocado pela ruptura da rede cristalina devido à presença de GalGB que se associaram ao cristal. Tal geometria tem menor área de superfície, quando comparado com os cristais COM com arestas e pontas (grupo controle), além disso, a presença de GalGB faz com que os cristais formados sejam bem menores, estes dois fatores facilitam a excreção urinária de cristais de CaOx pela urina [36].

A forma COD, apesar de ser instável, é muito comum na urina de pacientes saudáveis, o que indica que a urina naturalmente possui moléculas que estabilizam a forma COD, impedindo sua transformação na forma geométrica COM. Esse efeito também foi observado com a presença de GalGB. Tal estabilização tem um eficaz efeito protetor contra urolitíase já que os cristais COM tem uma maior capacidade de ligação às células do túbulo renal [22].

Para se comprovar a interação de GalGB com os cristais avaliou-se o potencial zeta (ζ) dos mesmos na presença e na ausência de GalGB. O potencial ζ é uma medida da carga total da superfície de partículas (inclusive moléculas) em relação às cargas da suspensão líquida na qual ele se encontra. Os cristais sem a presença de GalGB apresentaram um potencial ζ positivo, cujo valor determinado foi 9.76 ± 0.16 , que é explicado pela carga positiva dos íons de cálcio que compõem os cristais. Por outro lado, os cristais formados na presença de GalGB apresentaram um potencial ζ muito negativo, cujo valor foi de -23.42 ± 0.13 . Como GalGB é sulfatado e esses grupos sulfato apresentam cargas negativas nas condições de pH utilizadas para a formação dos cristais, então esse valor negativo do potencial ζ dos cristais provem de GalGB.

GalGB foi ligado covalentemente com FITC. Posteriormente, induziu-se a formação de cristais de oxalato na presença de GalGB-FITC. Os cristais formados foram então visualizados por microscopia de fluorescência. Como pode ser observado na figura 06, GalGB-FITC se encontra associado aos cristais. Esses dois resultados indicam que GalGB está associado aos cristais formados, inclusive na superfície dos cristais, o que permite a sua estabilização na forma COD.

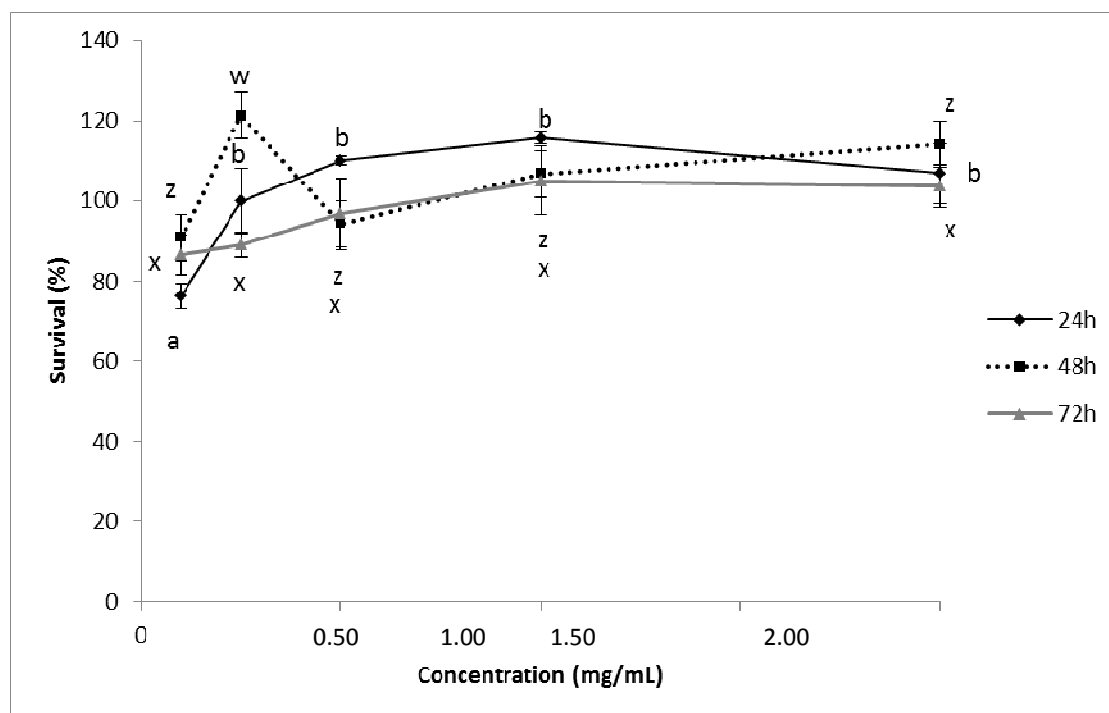
Figura 6. Os cristais CaOX formados na presença de GalGB-FITC. **(A)** Os cristais CaOx observados sob luz óptica. **(B)** Mesma área sob microscopia de fluorescência.



2.5. Avaliação do efeito citotóxico de GalGB frente a células renais humanas

Como GalGB modulou a formação de cristais de oxalato de cálcio, houve o interesse em verificar a sua toxicidade frente as linhagens celulares de rins. Neste caso, utilizou-se células renais humanas normais (linhagem HEK-293). Os dados são apresentados na figura 7. Como pode-se observar, GalGB não apresentou citotoxicidade em todas as condições avaliadas. Estes dados aqui apresentados apontam para o potencial de GalGB como possível composto para ser utilizado no tratamento da urolitíase. Experimentos com animais devem e serão realizados a fim de confirmarem este potencial. Além disso, esses dados foram muito interessantes, pois a alga *Gracilaria birdiae* é comestível. Então ela poderia ser apontada como um alimento funcional com atividade antioxidante e que potencialmente poderia ajudar no tratamento de urolitíase. Para tal, estudos de toxicidade da alga deverão ser feitos em animais e humanos a fim de se determinar os níveis seguros de consumo diários dessa alga.

Figura 7. Avaliação da toxicidade GalGB em células HEK-293. As células cresceram na presença de GalGB (0,125; 0,250; 0,500; 1,000; 1,500; 2,000 mg / mL) durante 24, 48 e 72 h. Depois, a viabilidade celular foi medida na presença ou ausência da GalGB utilizando o teste MTT. Letras diferentes indicam uma diferença significativa entre as concentrações do tratamento individual por Anova on way seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). * ^{b, z, w, x} letras diferentes denotam diferenças significativas entre cada concentração.

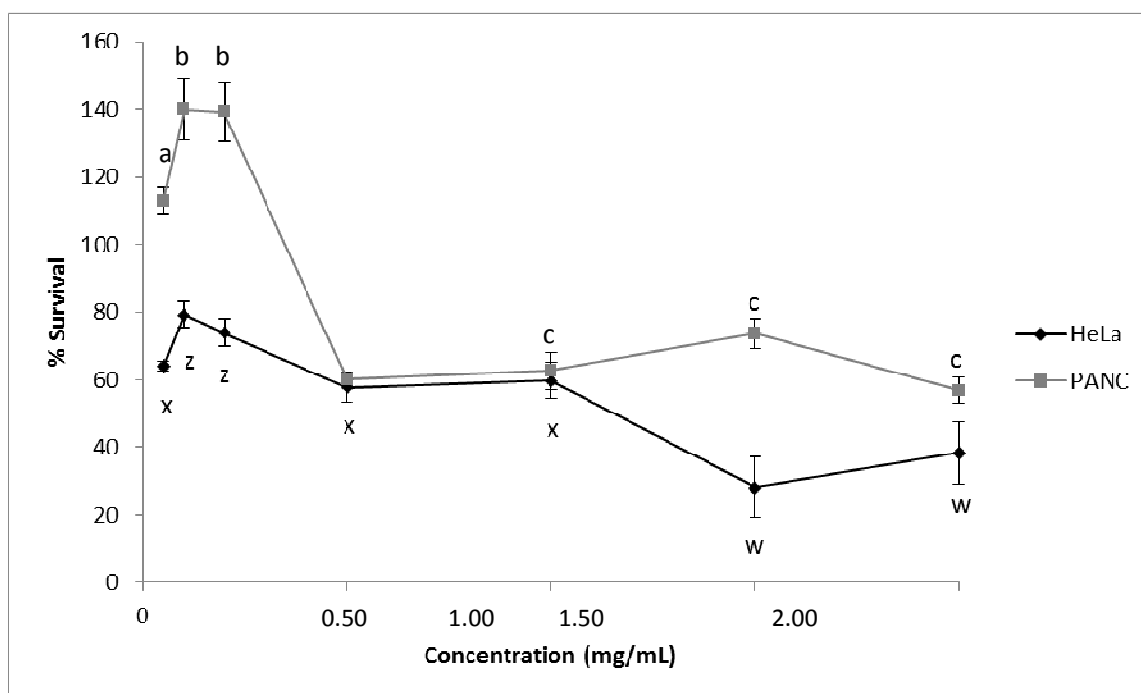


2.6. GalGB exibe atividade anti-proliferativa contra células tumorais

Avaliou-se o efeito de GalGB sobre a proliferação de células tumorais HeLa e PANC-1. GalGB inibiu a proliferação das células HeLa, chegando ao máximo de inibição (40%) com 0.5 mg/mL, este efeito não aumentou com o aumento da concentração de GalGB testada. Já com relação as células PANC-1, GalGB a suas proliferação em de 60% com 1 mg/mL (figura 8).

Além disso, para determinar se GalGB (0,125-2,0 mg / mL) apresentava citotoxicidade não específica em qualquer tipo de célula, também foi testado o efeito GalGB no crescimento de 3T3, uma linha de células de fibroblastos normais. Com esta linhagem celular GalGB mostrou inibição do crescimento das células (40%) apenas com a dose mais elevada (2,0 mg / mL) (dados não mostrados).

Figura 8. Influência da GalGB na inibição da proliferação de células de HeLa e PANC-1 após 24 h de incubação. Letras diferentes indicam uma diferença significativa entre as concentrações do tratamento individual por Anova one way seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). * a, b, c, z, w, x letras diferentes denotam diferenças significativas entre cada concentração.



Não foi encontrado nenhum artigo que avaliasse a atividade de GalGB frente a linhagens de células tumorais. Entretanto para polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria caudata* na concentração de 2,0mg/mL inibiu a proliferação de células HeLa em torno de 60% o que mostra que os polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria* apresentam boa atividade contra células de adenocarcinoma de útero humano; estudos posteriores poderão confirmar o potencial antitumoral dos polissacarídeos produzidos pelas algas do gênero *Gracilaria*, inclusive de GalGB [14]

3. Seção Experimental

3.1. Purificação de GalGB

A alga *Gracilaria birdiae* foi coletada na praia de Rio do Fogo, situado no litoral Nordeste do Rio Grande do Norte, cujas coordenadas geográficas são: latitude 05° 16' 22" Sul e longitude 35° 22' 59" Oeste. A extração de polissacarídeos sulfatados foi adaptada da metodologia descrita por Maciel e colaboradores [12]. A alga após a coleta foi limpa com água corrente e seca em estufa aerada a 45°C. Posteriormente foi triturada e submetida a um processo de despigmentação e delipidação. Após nova secagem sob temperatura ambiente, foram adicionados dois volumes de NaCl 0.25 M à massa resultante, e o pH foi ajustado para 8.0 com NaOH e adicionou-se Proxima (protease alcalina) a mistura para digestão proteolítica. Após 18 h de incubação a 60° C, a mistura foi filtrada e centrifugada (10.000 x g, 10 min., 4°C) e o sobrenadante foi precipitado com metanol. A seguir, o

precipitado foi separado da solução por centrifugação (10000 x g, 10 min., 4° C), secado e armazenado para as análises posteriores.

3.2. Eletroforese em gel de agarose

Eletroforese em gel de agarose da galactana sulfatada foi realizada em 0,6% de gel de agarose (7.5 cm x 10 cm × 0,2 centímetros de espessura) preparado em tampão de acetato de 1,3-diaminopropano 0,05, pH 9,0, como descrito anteriormente [15]. Alíquotas dos polissacarídeos (cerca de 50 ug) foram aplicadas ao gel e sujeito a electroforese. O gel foi fixado com uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio a 0,1% durante 2 h, secas e coradas durante 15 min com 0,1% de azul de toluidina em ácido acético a 1% em etanol a 50%. Foi então descorada utilizando a mesma solução sem o corante.

3.3. Análise química e composição monossacarídica

Após a hidrólise ácida dos polissacarídeos (4 M de HCl , 100 ° C , 6 h), o teor de sulfato foi determinado de acordo com o método de gelatina - bário [37] , utilizando-se sulfato de sódio como padrão . O teor de proteína foi medido pelo método de Spector [38] . Para determinar a melhor condição de hidrólise ácida do polissacarídeo utilizando HCl , isto é, em que a degradação do polímero ocorre sem destruir monossacarídeos libertados por esta degradação , GalGB foi hidrolisada com HCl 0,5 M , 1 M , 2 M e 4 M , em 30 min, 1 , 2 e 4 h, respectivamente. Uma temperatura de 100 ° C foi mantida em todas as condições de hidrólise . O material foi depois neutralizado, seco e ressuspenso em água , e os açúcares redutores foram determinados tal como descrito na Câmara et al . [39] . As melhores condições de hidrólise foi de 2 M de HCl durante 2h . Assim, GalGB foi hidrolisado (HCl 2 M , 100 ° C , 2 h) e a sua composição de açúcar foi determinada por um sistema LaChrom Elite ® HPLC da VWR - Hitachi com um detector de índice de refração (RI detector modelo L -2490) . A LiChroCART ® 250 coluna (250 mm x 40 mm) empacotada com LiChrospher ® 100 NH2 (5 um) foi acoplado ao sistema . A massa da amostra usada foi de 0,2 mg e o tempo de análise foi de 25 min ; como referências , os seguintes açúcares foram usados: arabinose , frutose , fucose , galactose , glicose, glicosamina , ácido glucurônico , manose , ácido manurônico , ramnose e xilose.

3.4. Atividade Anticoagulante

Os Testes APTT e PT foram realizadas, tal como descrito em [23]. A Heparina fracionada (enoxeparina; Sanofi-aventis, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado como padrão.

3.5. Atividades Antioxidantes *in vitro*

3.5.1. Capacidade Antioxidante Total (TAC)

O método de ensaio está baseado na redução de Mo^{+6} Mo^{+5} pela amostra e a subsequente formação de um complexo de fosfato de verde / Mo^{+5} numa solução ácida. As

amostras foram incubadas a 95 ° C durante 90 minutos; os tubos continham o GalGB e solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e 4 mM de molibdato de amônio). Após a mistura ter arrefecido até à temperatura ambiente, a absorvância de cada solução foi medida a 695 nm contra um branco. A capacidade antioxidante foi expressa em mg de ácido ascórbico equivalente.

O poder redutor foi quantificado de acordo com metodologia descrita por Silva e colaboradores [40]. 4 mL das amostras teste em diferentes concentrações (0.10-1.00mg/mL) foram misturadas em tampão fosfato (0.2M, pH 6.6) e ferricianeto de potássio (1%) e incubados por 20 min a 50 °C. A reação foi interrompida pela adição de TCA (ácido tricloroacético) a 10%. Posteriormente, foi misturada água destilada e cloreto de ferro (0.1%). As amostras foram lidas a 700 nm.

3.5.3. Ensaio do Sequestro do Radical Hidroxila

O ensaio de sequestro do radical hidroxila foi baseado na reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$) e os resultados foram expressos como taxa de inibição como descrito por Costa et al.(14). Os radicais hidroxila foram gerados utilizando 3 mL de tampão de fosfato de sódio (150 mM, pH 7.4), que continha 10 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM de EDTA, 2 mM de salicilato de sódio, 30% de H_2O_2 (200 mL) e variando concentrações de GalGB. No controle, tampão fosfato de sódio substituiu o H_2O_2 . As soluções foram incubadas a 37 °C durante 1 h, e a presença do radical hidroxilo foi detectada através da monitoramento da absorvância a 510 nm. O ácido gálico foi utilizado como controle positivo.

3.5.4. Ensaio de sequestro do radical superóxido

Este ensaio foi baseado na capacidade de polissacarídeos sulfatados de inibir a redução fotoquímica do nitroazul de tetrazólio (NBT), no sistema de riboflavina-luz-NBT. Cada 3 mL de mistura de reação continha tampão de fosfato 50 mM (pH 7.8), 13 mM de metionina, riboflavina 2 mM, EDTA a 100 mM, NBT (75 mM) e 1 mL de solução da amostra. Após a produção de azul de formazan, foi determinado o aumento da absorvância a 560 nm após 10 minutos de iluminação com uma lâmpada fluorescente. A montagem de toda reação foi fechada em uma caixa forrada com papel alumínio. Tubos idênticos à mistura de reação foram mantidos no escuro e serviu como branco da reação. O ácido gálico foi utilizado como controle positivo.

3.5.5. Quelação férrica

A capacidade de quelar ferro de GalGB foi investigada utilizando a seguinte metodologia: GB, em diferentes concentrações, foi aplicadas com a mistura de reação, que continha FeCl_2 (0.05 mL, 2 mM) e ferrozina (0,2 ml, 5 mM). A mistura foi agitada e incubada durante 10 min à temperatura ambiente e a absorvância da mistura foi medida a 562 nm contra um branco. O EDTA foi utilizado como controle positivo.

3.5.6 Quelação cúprica

A habilidade de quelar o íon cobre de GalGB foi determinada pelo método descrito em Teodosio Melo e colaboradores [22]. O violeta de pirocatecol, reagente utilizado neste ensaio, tem a capacidade de associar com alguns cátions como alumínio, cobre, bismuto e tório. Na presença de agentes quelantes esta associação não é formada, resultando na diminuição da coloração. Tal diminuição permite, assim, estimar a atividade quelante do íon cobre de GalGB. O teste é realizado em microplaca de 96 poços que conterá uma mistura de reação contendo diferentes concentrações das amostras (0.1 – 2.0 mg/mL), Violeta de Pirocatecol (4 mM) e Sulfato de Cobre II pentahidratado (5 H₂O) (50 µg/mL). Todos os poços foram homogeneizados com um auxílio de uma micropipeta e a absorbância da solução foi medida a 632 nm. A habilidade, das amostras, em quelar o íon cobre foi calculada usando a equação abaixo:

$$\frac{\text{Absorbância do branco} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do branco}} \times 100$$

$$\text{Absorbância do branco} \times 100$$

3.6. Ensaio de Cristalização do Oxalato de Cálcio

O efeito de GalGB na cristalização de oxalato de cálcio foi medido espectrofotometricamente durante 30 min a 620 nm, conforme descreve Zhang e colaboradores [34]. Esse ensaio é baseado na quantificação por densidade óptica de soluções metaestáveis de Ca²⁺ e Ox. Utilizando uma mistura de cloreto de cálcio (8 mmol/L) e oxalato de sódio (1 mmol/L), 200 mmol/L de cloreto de sódio e 10 mmol/L de acetato de sódio. As concentrações de compostos presentes nesta mistura estão perto das concentrações fisiológicas urinárias. A solução de CaCl₂ (1.0 mL) foi agitada constantemente a 37° C tanto na ausência quanto na presença de diferentes concentrações dos polissacarídeos sulfatados ou o do citrato sódico como controle positivo. Após a obtenção de uma linha de base estável, a cristalização foi induzida pela adição de solução de Na₂C₂O₄ (1.0 mL) para atingir concentrações finais de 4 mmol/L de cálcio e de 0.5 mmol/L de oxalato. A partir de uma análise de regressão linear foi possível mensurar o percentual de inibição da cristalização. A percentagem foi calculada a partir das taxas de nucleação e de agregação, como se segue: $[1 - (SN_A/SN_C)] \times 100$ para o percentual de nucleação, sendo SN_A a inclinação da curva de absorbância da solução de sais na presença das amostras e SN_C a inclinação do controle; $[1 - (SA_A/SA_C)] \times 100$ para o percentual de agregação, sendo SA_A a inclinação da curva de absorbância da solução de sais na presença das amostras e SA_C a inclinação da absorbância do controle;

3.7. *Análise de Imagem de cristal Morfologia*

Os cristais foram induzidos a se formarem na presença ou ausência de GalGB. Após trinta minutos, as soluções foram centrifugadas (5000 x g) e sobrenadante foi descartado. Os cristais foram então suspensos em 0.5 mL de água e uma alíquota de 0.1 mL foi posta numa lâmina histológica e levada a um microscópio. A morfologia dos cristais foi analisada em dez campos selecionados aleatoriamente em ampliação de 60×. As imagens foram capturadas a partir de diferentes campos. Foram realizados três experimentos distintos.

3.8. *Medida de potencial zeta (ζ)*

Os cristais foram induzidos a se formarem na presença ou ausência GalGB. Após trinta minutos, as soluções foram centrifugadas (5000 x g). O concentrado de cristais foi então suspenso com 1.5 mL de água e o potencial zeta das amostras ζ foi obtido com o uso do analisador Zeta Plus®.

3.9. *Conjugação de GalGB com fluoresceína*

Marcação com fluoresceína B foi preparada por conjugação de sal de sódio de fluoresceína (Sigma). Resumidamente, 5 mg de GalGB reagiram com 1 mg de fluoresceína na solução 0,1 M de PBS (pH 7,0) e agitou-se durante 1 hora ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. A solução foi dialisada contra água deionizada (Mw de corte de 12 kDa) e, em seguida, liofilizado.

3.10. *Ensaio de MTT*

O ensaio do MTT foi realizado como descrito por Almeida -Lima et al [41]. HeLa, 3T3, PANC - 1 e células HEK-293 foram cultivadas em frascos de cultura em meio DMEM com 10 % soro fetal bovino com 100 ug / mL de estreptomicina e 100 IU / mL de penicilina (Sigma). As células foram colocadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 células / poço e deixadas a aderir durante a noite a 37° C e 5 % de CO₂. No ensaio antiproliferativo, GalGB foi adicionado (125, 250, 500, 1000, 1500 ou 2000 mg / mL). Após o tempo determinado (24, 48 ou 72 h) de incubação, os vestígios de GalGB foram removidas por lavagem das células com PBS. Meio fresco e 10 µL de 12 mM de MTT (Sigma) (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), dissolvido em PBS foi adicionado para determinar os efeitos da amostra sobre a proliferação celular. As células foram então incubadas durante 4 h a 37° C e 5 % de CO₂. Para solubilizar o produto de MTT reduzido, 100 µL de isopropanol contendo 0,04 N de HCl foi adicionado a cada poço e completamente misturados utilizando um pipetador multicanal. Dentro de 1 hora de adição de HCl - isopropanol, a absorvância a 570 nm foi lida utilizando um leitor de microplacas Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Franklin, MA, EUA). A percentagem de proliferação celular foi calculada como se segue:

$$\text{Proliferação celular (\%)} = \frac{\text{Abs. 570 nm da amostra}}{\text{Abs. 570 nm do controle}} \times 100$$

3.11. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way. Student-Newman-Keuls post-testes foram realizados por comparação múltipla grupo. Em todos os casos, a significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

4. Conclusões

A alga vermelha *Gracilaria birdiae* sintetiza uma heterogalactana sulfatada (GalGB) que apresenta diferentes mecanismos antioxidantes *in vitro*, como também inibe a agregação de cristais de oxalato de cálcio, bem como modifica sua morfologia e tamanho. Ademais, GalGB não é citotóxica para células renais humanas. Estudos *in vivo* se fazem necessários para comprovar os dados obtidos *in vitro* e indicarem o uso ou não de GalGB no tratamento e prevenção de urolitíase.

Por outro lado GalGB se mostrou eficiente como um composto antiproliferativo para as linhagens tumorais de carcinoma cervical e pancreático. Dado seu efeito sobre diferentes atividades realizadas, *Gracilaria Birdiae* revela ter, portanto, um excelente potencial, tanto por ser um possível alimento funcional, quanto por servir como matéria-prima para fabricação de fármacos. Contudo, experimentos posteriores devem e serão realizados a fim de confirmarem este potencial.

Agradecimentos

Queremos agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, a Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte - FAPERN, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI pelo seu apoio financeiro na forma de subsídios e bolsas de estudo. Hugo A. O. Rocha agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade. Rafael Câmara e Karoline Melo agradecem pela bolsa de doutorado da CAPES. Gabriel P Fidelis e Moacir F. Queiroz agradecem pela bolsa de mestrado da CAPES. Arthur A. J. Vidal agradece ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica. Esta pesquisa foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte da dissertação de Msc de Leticia C. B. P. Oliveira.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

Referências

1. Pangestuti, R., Kim, S. K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J funct foods* **2011**, 3, 255-266.
2. Prajapati, V. D., Maheriya, P. M., Jani, G. K., & Solanki, H. K. Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 105, 97 – 112.
3. Wijesekara, I.; Pangestuti, R.; Kim, S.-K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr. Polym.* **2010**, 84, 14–21.
4. Yende SR, Harle UN, Chaugule BB. Therapeutic potential and health benefits of Sargassum species. *Pharmacogn Rev.* **2014**, 8,1-7.
5. Namvar, F., P. M. Tahir, R. Mohamad, M. Mahdavi, P. Abedi, T. F. Najafi, H. S. Rahmanand and M. Jawaid. Biomedical properties of edible seaweed in cancer therapy and chemoprevention trials: a review. *Nat Prod Commun.* **2013**, 8, 1811-1820.
6. Kim S.K., Li Y.X.: Medicinal benefits of sulfated polysaccharides from sea vegetables. *Adv Food Nutr Res.* **2011**, 64, 391–402.
7. Pomin, V.H. Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well defined structures. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1820, 1971–1979.
8. Senni, K.; Pereira, J.; Gueniche, F.; Delbarre-Ladrat, C.; Siquin, C.; Ratiskol, J.; Godeau, G.; Fisher, A.M.; Helley, D.; Collic-Jouault, S. Marine polysaccharides: A source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. *Mar. Drugs* **2011**, 9, 1664–1681.
9. Jimenez-Escrig A., Gomez-Ordóñez E., Ruperez P. Seaweed as a source of novel nutraceuticals: sulfated polysaccharides and peptides. *Adv. Food Nutr. Res.* **2011**, 64,325–337.
10. Capo, T.R.; Jaramillo, J.C.; Boyd, A.E.; Lapointe, B.E.; Serafy, J.E. Sustained high yields of *Gracilaria* (Rhodophyta) grown in intensive large-scale culture. *J. Appl. Phycol.* **1999**, 11, 143–147.
11. Marinho-Soriano, E., Moreira, W. S. C., & Carneiro, M. A. A. Some aspects of the growth of *Gracilaria birdiae*(Gracilariales, Rhodophyta) in an estuary in northeast Brazil. *Aquacult Int*, **2006**, 14, 327–336.
12. Maciel, J. S., Chaves, L. S., Souza, B. W. S., Teixeira, D. I. A., Freitas, A. L. P., Feitosa, J. P. Paula, R.C.M. Structural characterization of cold extracted fraction of

- solublesulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Carbohydr. Polym.* **2008**, 71, 559–565.
13. Vanderlei ESO, Araújo IWF, Quinderé ALG, Fontes BP, Eloy YRG, Rodrigues JAG *et al.* The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Inflamm Res* **2011** 60, 1121–1130.
 14. Costa, L.S.; Fidelis, G.P.; Cordeiro, S.L.; Oliveira, R.M.; Sabry, D.A.; Câmara, R.B.G.; Nobre, L.T.D.B.; Costa, M.S.S.P.; Almeida-Lima, J.; Farias, E.H.C.; Leite, E.L.; Rocha, H.A.O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed. Pharmacother* **2010**, 64, 21–28.
 15. Dietrich, C.P.; Dietrich, S.M.C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. *J. Chromatogr.*, **1976**, 130, 299 – 304.
 16. Rioux, L. E.; Turgeon, S. L.; Beaulieu, M. Effect of season on the composition of bioactive polysaccharides from the brown seaweed *Saccharina longicurris*. *Phytochem.* **2009**, 70, 1069-1075.
 17. Fonseca RJC, Oliveira SNMCG, Melo FR, Pereira MG, Benevides NMB, Mourao PAS. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. *Thromb Haemost* **2008**; 99,539–45.
 18. Jiao, G.; Yu, G.; Zhang, J.; Ewart, H. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs* **2011**, 9, 196–223.
 19. Souza, B. W., Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Martins, J. T., Teixeira, J. A., Coimbra, A.A. & Vicente, A. A. (2012). Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food hydrocolloids*, **2012** 27, 287-292.
 20. Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.* **2010**, 89, 217 – 233.
 21. Costa, L.S.; Fidelis, G.P.; Telles, C.B.; Dantas-Santos, N.; Camara, R.B.; Cordeiro, S.L.; Costa, M.S.; Almeida-Lima, J.; Melo-Silveira, R.F.; Oliveira, R.M.; et al. Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. *Mar. Drugs* **2011**, 9, 952–966.
 22. Teodosio Melo, K. R., Gomes Camara, R. B., Queiroz, M. F., Jacome Vidal, A. A., Machado Lima, C. R., Melo-Silveira, R. F., Almeida-Lima, J. & Oliveira Rocha, H. A. Evaluation of Sulfated Polysaccharides from the Brown Seaweed *Dictyopteris Justii* as Antioxidant Agents and as Inhibitors of the Formation of Calcium Oxalate Crystals. *Molecules*, **2013** 18, 4543-14563.
 23. Costa, M.S.S.P.; Costa, L.S.; Cordeiro, S.L.; Almeida-Lima, J.; Dantas-Santos, N.; Magalhães, K.D.; Sabry, D.A.; Albuquerque, I.R.L.; Pereira, M.R.; Leite, E.L.; Rocha, H.A.O. Evaluating the possible anticoagulant and antioxidante effects of sulfated polysaccharides from the tropical green alga *Caulerpa cupressoides* var. *flabella*. *J. Appl. Phycol.* **2012**, 24, 1159–1167.
 24. Wickens, A. P. Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol*, **2001**, 128, 379-391.

-
25. Qi H, Zhang Q, Zhao T, Chen R, Zhang H, Niu X, et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *Int J Biol Macromol* **2005**;37:195-9.
 26. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Li Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol* **2008**;42:127–32.
 27. Svingen, B.A.; Buege, J.A.; O’Neal, F.O.; Aust, S.D. The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 5892–5899.
 28. Mak, W.; Hamid, N.; Liu, T.; Lu, J.; White, W.L. Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 95, 606–614.
 29. Silveira, R. F. M., Fidelis, G. P., Costa, M. S. S. P., Telles, C. B., Santos, N. D. ; Elias, S. O., Ribeiro, V. B.; Barth, A. L., Macedo, A. J. ; Leite, E.L. ; Rocha, H. A. O., . In Vitro Antioxidant, Anticoagulant and Antimicrobial Activity and in Inhibition of Cancer Cell Proliferation by Xylan Extracted from Corn Cobs. *Inter J Molec Scienc* , **2012**, 13, 409-426.
 30. Bashir, S.; Gilani, A.H. Antiuro lithic effect of *Bergenia ligulata* rhizome: An explanation of the underlying mechanisms. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, 122, 106–116.
 31. Ramasamy, S. Calcium oxalate stone disease: Role of lipid peroxidation and antioxidant. *Urol. Res.* **2002**, 30, 35–37.
 32. Grases, F.; Costa-Bauza, A.; Garcia-Ferragut, L. Biopatological crystalization: A general view about the mechanisms of renal stone formation. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1998**, 74, 169–194.
 33. López, M.; Hoppe, B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatr. Nephrol.* **2010**, 25, 49–59.
 34. Zhang, C.Y.; Wu, W.H.; Wang, J.; Lan, M.B. Antioxidant properties of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and its effects on calcium oxalate crystallization. *Mar. Drugs.* **2012**, 10, 119–130.
 35. Hess, B.; Nakagawa, Y.; Coe, F.L. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *Am. J. Physiol* **1989**, 257, F99–F106.
 36. Ouyang, J.M.; Zheng, H.; Deng, S.P. Simultaneous formation of calcium oxalate (mono-, di-, and trihydrate) induced by potassium tartrate in gelatinous system. *J. Cryst. Growth* **2006**, 293, 118–123.
 37. Dodgson, K.S.; Price, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* **1962**, 84, 106–110.
 38. Spector, J. Refinement of the comassie blue method of protein quantification. A simple and liner spectrofotometric assay of 0.5 to 50 µg of protein. *Anal. Biochem.* **1978**, 86, 142–146.
 39. Camara, R.B.G.; Costa, L.S.; Fidelis, G.P.; Nobre, L.T.D.B.; Dantas-Santos, N.; Cordeiro, S.L.; Costa, M.S.S.P.; Alves, L.G.; Rocha, H.A.O. Heterofucans from the brown seaweed

- Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 124–138.
40. Silva, J. M. C. ; Dantas-Santos, N. ; Gomes, D. L. ; Costa, L. S. ; Cordeiro, S.L. ; Costa, M.S.S.P ; Silva, N. B. ; Freitas, M. L. ; Scortecci, K. C. ; Leite, E. L. ; Rocha, H. A. O. Biological activities of the sulfated polysaccharide from the vascular plant *Halodule wrightii*. *Rev Bras Farm (Impress)*, **2012**, *22*, 94-101.
41. Almeida-Lima, J ; Costa, L.S ; Silva, N. B. ; Silveira, R. F. M. ; Silva, F. V. ; Felipe, M. B. M. C. ; Batistuzzo, S.R ; Leite, E. L. ; Rocha, H. A. O. . Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan. *J Appl Toxicol*, **2010**, *30*, 708-715.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

6. COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES

Diante das informações descritas e das intenções acerca da pesquisa, pode-se afirmar que os objetivos foram alcançados e ainda com acréscimos que possibilitaram uma maior visibilidade do potencial do objeto de estudo em questão. Algumas alterações metodológicas bem como adequações foram realizadas no decorrer do tempo, entretanto as mesmas só agregaram valor à pesquisa.

A multidisciplinaridade é característica presente no laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL), o que facilita e propicia intercâmbio de conhecimentos e traz originalidade às pesquisas desenvolvidas, bem como confere mérito à toda a equipe por desenvolver pesquisas em um ambiente multidisciplinar onde todos estão dispostos a dividir conhecimentos e construir novas metodologias.

Na trajetória do mestrado posso afirmar que alcancei uma grande evolução intelectual, a qual continua em construção e certamente tenho muito mais a evoluir seguindo esta trajetória com a caminhada constante em busca do aprimoramento, a qual seguirá em um futuro doutorado.

As metas propostas foram alcançadas e novas metas surgiram no percurso da pesquisa, as quais suscitaram o desejo de dar continuidade para progredir nos achados científicos no que se refere à área da nutrição, tendo como base o estudo de compostos bioativos em algas e outros alimentos, a fim de proporcionar aos indivíduos meios eficazes de prevenir, promover, e por que não tratar doenças através destas constatações científicas acerca das propriedades nutricionais dos alimentos.

Componho o grupo de pesquisa do BIOPOL, estou inserida em pesquisa junto ao meu orientador. Há a perspectiva futura de dar continuidade à esta bem como iniciar novas pesquisas já como parte de um futuro doutorado.

7. REFERÊNCIAS

1. Pangestuti, R.; Kim, S.K. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **J funct foods**, 3(4), 255-266, 2011.
2. Rocha, H.A.O.; Alves, L.G.; Leite, E.L. Aproveitamento integral de algas marinhas. In: Alex Augusto Gonçalves. (Org.). Tecnologia do Pescado - Ciencia, Tecnologia, inovação e legislação. 1ed. Sao Paulo: Atheneu, 2011, v. 1, p. 454-463.
3. ANVISA. **RESOLUÇÃO RDC N.º 2, DE 7 DE JANEIRO DE 2002**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c77370047457bcc8888dc3fbc4c6735/RDC_02_2002.pdf?MOD=AJPERES
4. Pollonio, M.A.R. Alimentos Funcionais: As recentes tendências e os aspectos de segurança envolvidos no consumo. **Revista Higiene Alimentar**, v.14, n. 74, p.26-31, 2000.
5. Vasconcelos, S.M.L.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Manfredini, V.; Benfato, M.S.; Kubota, L.T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.
6. Wijesekara, I.; Pangestuti, R.; Kim, S.-K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydr. Polym.** 2010, in press.
7. Yende, S.R.; Harle, U.N.; Chaugule, B.B. Therapeutic potential and health benefits of Sargassum species. **Pharmacogn Rev**, 8(15):1-7, 2014.
8. Namvar, F.; Tahir, P.M.; Mohamad, R.; Mahdavi, M.; Abedi, P.; Najafi, T.F.;

-
- Rahmanand, H.S.; Jawaid, M. Biomedical properties of edible seaweed in cancer therapy and chemoprevention trials: a review. **Nat Prod Commun**, 8(12), 1811-1820, 2013.
9. Kim, S.K.; Li, Y.X. Medicinal benefits of sulfated polysaccharides from sea vegetables. **Adv Food Nutr Res**, 64:391–402, 2011.
10. Pomin, V.H. Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well defined structures. **Biochim. Biophys. Acta**, 1820, 1971–1979, 2012.
11. Senni, K.; Pereira, J.; Gueniche, F.; Delbarre-Ladrat, C.; Sinquin, C.; Ratiskol, J.; Godeau, G.; Fisher, A.M.; Helley, D.; Collic-Jouault, S. Marine polysaccharides: A source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. **Mar. Drugs**, 9, 1664–1681, 2011.
12. Jimenez-Escrig, A.; Gomez-Ordóñez, E.; Ruperez, P. Seaweed as a source of novel nutraceuticals: sulfated polysaccharides and peptides. **Adv. Food Nutr. Res**, 64:325–337, 2011.
13. Berger, M.M. Can oxidative damage be treated nutritionally? **Clin. Nutr.** 4(2), p. 172-183, 2005.
14. Costa, L.S. **Atividades Biológicas de Polissacarídeos Sulfatados extraídos da alga vermelha *Gracilária caudata***. 2008. 70f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal/RN, 2008.
15. Wickens, A.P. Ageing and the free radical theory. **Respiratory Physiology**, 128 (3), 379-391, 2001.
16. Cuzzocrea, Salvatore et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury.

Pharmacological reviews, v. 53, n. 1, p. 135-159, 2001.

17. J.M.C. Gutteridge, B. Halliwell. Mini Review. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393 (2010) 561–564
18. Zhang, Q. et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanesis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 6, 2003.
19. Heo, S-J. et al. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1613-1623, 2005.
20. Wang, J. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 127-132, 2008.
21. Magalhaes, K.D. et al. Anticoagulant, antioxidant and antitumor activities of heterofucans from the seaweed *Dictyopterus delicatula*. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3352-3365, 2011.
22. Costa, L.S.; Fidelis, G.P.; Cordeiro, S.L.; Oliveira, R.M.; Sabry, D.A.; Câmara, R.B.G.; Nobre, L.T.D.B.; Costa, M.S.S.P.; Almeida-Lima, J.; Farias, E.H.C.; Leite, E.L.; Rocha, H.A.O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed. Pharmacother* **2010**, 64, 21–28.
23. Brito TV, Neto JP, Prudêncio RS, Batista JA, Júnior JS, Silva RO, Franco AX, Aragão KS, Soares PM, Souza MH, Chaves LS, Freitas AL, Medeiros JV, Barbosa AL. Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorate trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2014 Aug;66(8):1161-70.
24. Athukorala, Y.; Kim, K.N.; Jeon, Y.J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food Chemistry**

-
- Toxicology**, England, v. 44, n. 7, p. 1065-1074, 2006.
25. Almeida-lima, J. et al. Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 7, p. 708-715, 2010.
26. Salgaller, L.; Lodge, A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. *J. Surg. Oncol.*, v. 68, p. 122–138, 1998.
27. Loriot, Y.; Perlemuter, G.; Malka, D.; Penault-Llorca, F.; Boige, V.; Deutsch, E.; Massard, C.; Armand, J.P.; Soria, J.C. Drug insight: gastrointestinal and hepatic adverse effects of molecular targeted agents in cancer therapy. **Nat Clin Pract Oncol.**, 5(5):268–278, 2008.
28. Athukorala, Y.; Ahn, G.N.; Jee, Y.H.; Kim, G.Y.; Kim, S.H.; Ha, J.H.; Kang, J.S.; Lee, K.W.; Jeon, Y.J. Antiproliferative activity of sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of *Ecklonia cava* on the U-937 cell line. **J. Appl. Phycol.**, 21:307–314, 2009.
29. Noda, H.; Amano, H.; Arashima, K.; Nisizawa, K. Antitumor activity of marine algae. **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 577–584, 1990.
30. Yuana, H.; Songa, J.; Li, X.; Li, N.; Dai, J. Immunomodulation and antitumor activity of k-carrageenan oligosaccharides. **Cancer Letters**, v. 243, p. 228–234, 2006.
31. Stevan, F.R.; Oliveira, M.B.M.; Bucchi, D.F.; Nosedá, M.D.; Iacomini, M.; Duarte, M.E.R. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 33, p. 477–484, 2001.

32. Moe, Orson W. Kidney stones: pathophysiology and medical management. **The lancet**, v. 367, n. 9507, p. 333-344, 2006.
33. Liu, W. et al. Vitamin D receptor gene (VDR) polymorphisms and the urolithiasis risk: an updated meta-analysis based on 20 case-control studies. **Urolithiasis** (2014) 42:45-52, 2013.
34. Selvam, R. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. **Urological research**, v. 30, n. 1, p. 35-47, 2002.
35. Knoll, T. Epidemiology, pathogenesis, and pathophysiology of urolithiasis. **European Urology Supplements**, v. 9, n. 12, p. 802-806, 2010.
36. Coe, F.L.; Parks, J.H.; Favus, M.J. Diet and calcium: the end of an era. **Annals of internal medicine**, v. 126, n. 7, p. 553-555, 1997.
37. Yu, Shi-Liang et al. Oxalate impairs aminophospholipid translocase activity in renal epithelial cells via oxidative stress: implications for calcium oxalate urolithiasis. **The Journal of urology**, v. 186, n. 3, p. 1114-1120, 2011.
38. Grases, F. et al. Effects of phytic acid on renal stone formation in rats. **Scandinavian journal of urology and nephrology**, v. 32, n. 4, p. 261-265, 1998.
39. Grases, F.; Genestar, C.; Millan, A. The influence of some metallic ions and their complexes on the kinetics of crystal growth of calcium oxalate. **Journal of Crystal Growth**, v. 94, n. 2, p. 507-512, 1989.
40. Khan, S.R. Reactive oxygen species as the molecular modulators of calcium oxalate kidney stone formation: evidence from clinical and experimental investigations. **The Journal of urology**, 2012.

-
41. Ouyang, Jian-Ming et al. Renal epithelial cell injury and its promoting role in formation of calcium oxalate monohydrate. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 405-416, 2011.
 42. Zhang, Chao-Yan et al. Antioxidant properties of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and its effects on calcium oxalate crystallization. **Marine drugs**, v. 10, n. 1, p. 119-130, 2012.
 43. Capo, T.R.; Jaramillo, J.C.; Boyd, A.E.; Lapointe, B.E.; Serafy, J.E. Sustained high yields of *Gracilaria* (Rhodophyta) grown in intensive large-scale culture. **J. Appl. Phycol.**, 11, 143–147, 1999.
 44. Marinho-Soriano, E.; Moreira, W.S.C.; Carneiro, M.A.A. Some aspects of the growth of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in an estuary in northeast Brazil. **Aquacult Int**, 14, 327–336, 2006.
 45. Maciel, J.S.; Chaves, L.S.; Souza, B.W.S.; Teixeira, D.I.A.; Freitas, A.L.P.; Feitosa, J.P.; Paula, R.C.M. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydr. Polym.**, 71, 559–565, 2008.
 46. Vanderlei, E.S.O.; Araújo, I.W.F.; Quinderé, A.L.G.; Fontes, B.P.; Eloy, Y.R.G.; Rodrigues, J.A.G. et al. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflamm Res**, 60:1121–1130, 2011.
 47. Dodgson, K.S.; Price, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, 84, 106–110, 1962.
 48. Spector, J. Refinement of the comassie blue method of protein quantification. A simple and liner spectrofotometric assay of 0.5 to 50 µg of protein. **Anal. Biochem.**, 86, 142–146, 1978.

-
49. Câmara, R.B.G.; Costa, L.S.; Fidelis, G.P.; Nobre, L.T.D.B.; Dantas-Santos, N.; Cordeiro, S.L.; Costa, M.S.S.P.; Alves, L.G.; Rocha, H.A.O. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. **Mar. Drugs.**, 9, 124–138, 2011.
50. Costa, M.S.S.P.; Costa, L.S.; Cordeiro, S.L.; Almeida-Lima, J.; Dantas-Santos, N.; Magalhães, K.D.; Sabry, D.A.; Albuquerque, I.R.L.; Pereira, M.R.; Leite, E.L.; Rocha, H.A.O. Evaluating the possible anticoagulant and antioxidant effects of sulfated polysaccharides from the tropical green alga *Caulerpa cupressoides* var. *flabella*. **J. Appl. Phycol.**, 24, 1159–1167, 2012.
51. Silva, J.M.C.; Dantas-Santos, N.; Gomes, D.L.; Costa, L.S.; Cordeiro, S.L.; Costa, M.S.S.P.; Silva, N.B.; Freitas, M.L.; Scortecci, K.C.; Leite, E.L.; Rocha, H.A.O. Biological activities of the sulfated polysaccharide from the vascular plant *Halodule wrightii*. **Rev Bras Farm (Impress)**, 22, 94–101, 2012.
52. Teodosio Melo, K.R.; Gomes Camara, R.B.; Queiroz, M.F.; Jacome Vidal, A.A.; Machado Lima, C.R.; Melo-Silveira, R.F.; Almeida-Lima, J.; Oliveira Rocha, H.A. Evaluation of Sulfated Polysaccharides from the Brown Seaweed *Dictyopteris Justii* as Antioxidant Agents and as Inhibitors of the Formation of Calcium Oxalate Crystals. **Molecules**, 18, 4543–14563, 2013.
53. Zhang, C.Y.; Wu, W.H.; Wang, J.; Lan, M.B. Antioxidant properties of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and its effects on calcium oxalate crystallization. **Mar. Drugs.**, 10, 119–130, 2012.